Aus der II. Inneren Abteilung des Krankenhauses
Berlin-Neukölln
Chefärztin: Prof. Dr. med. Irene Boll

WIRKUNGEN VON MENSCHLICHEM β-INTERFERON (FIBROBLASTENINTERFERON) AUF STIMULIERTE UND UNSTIMULIERTE BLUTKULTUREN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Claudia Kretzschmar
aus Backnang

1983

UNIV.
LEIDEN
ICL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546618_0036

Aus der II. Inneren Abteilung des Krankenhauses
Berlin- Neukölln
Chefärztin: Prof. Dr. med. Irene Boll

WIRKUNGEN VON MENSCHLICHEM β- INTERFERON (FIBROBLASTENINTERFERON) AUF STIMULIERTE UND UNSTIMULIERTE BLUTKULTUREN

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Claudia Kretzschmar
aus Backnang

Referent : Prof. Dr. med. Irene Boll

Korreferent : Prof. Dr. H. Brücher

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am : 25. 8. 1983

Inhaltsverzeichnis:

I. Einleitung	S. 5
II. Material und Methodik	S.10
III.Ergebnisse	S.14
IV. Diskussion	S.35
V. Zusammenfassung	S.46
VI. Tabellenanhang	S.47
VII.Literaturverzeichnis	S.53

I. Einleitung

1957 entdeckten Isaacs und Lindenmann eine Eiweißsubstanz, deren hervorstechende Eigenschaft ihre antivirale Wirkung war. Sie nannten sie Interferon. Heute versteht man unter Interferon eine ganze Gruppe von Glykoproteinen, die antivirale, antiproliferative und immunmodulierende Eigenschaften besitzt.

Beim Menschen sind drei unterschiedliche Interferone bekannt: Zum säurestabilen Typ I- Interferon gehören Leukozyteninterferon und Fibroblasteninterferon, die nach der von Stewart(1980) empfohlenen neuen Nomenklatur alpha-Interferon und ß- Interferon genannt werden. Das säurelabile Typ II- Interferon wurde bisher als Immuninterferon bezeichnet, heute heißt es gamma- Interferon. Alpha- Interferon stellt man aus menschlichen Leukozyten von Blutkonserven her; ß- Interferon entsteht in Gewebekulturen aus diploiden Fibroblasten, und gamma- Interferon wird in lymphoblastoiden Zellkulturen gebildet.

Zur Anregung der Interferonproduktion benutzt man induzierende Substanzen. Bei diesen "inducers" kann es sich um Viren, Bakterien, Mitogene, Tumorzellen und synthetische Substanzen handeln. Das für die vorliegende Arbeit verwendete ß- Interferon wird von menschlichen Fibroblasten (FS 4- Zellen) gebildet, die durch Induktion mit einer synthetischen, doppelsträngigen RNS (polyI:C) zur Interferonproduktion angeregt werden (Havell 1972, Billiau 1973, Vilcek 1978). Um die Ausbeute zu erhöhen, wendet man den Kunstgriff der Superinduktion an. Der Zusatz von Antimetaboliten wie Aktinomycin D und Cycloheximid steigert die ß- Interferonproduktion erheblich (Tan 1970, Myers 1971).

ine weitere Beobachtung war, daß eine Vorbehandlung der
nterferonproduzierenden Zellen mit Interferon, genannt
riming, die Ausbeute erheblich steigert (Stewart 1971).
enschliches ß- Interferon hat ein Molekulargewicht von
0000 (Knight 1976 a). Seine Aminosäurensequenz konnte in-
wischen mit verschiedenen Methoden bestimmt werden (Derynck
980, Houghten 1980, Taniguchi 1980). Tan (1979) fand zusätz-
ich zum Proteinanteil Galaktosamine und Mannosamine, die den
ohlenhydratanteil des Moleküls repräsentieren, und Disulfid-
rücken, die an der biologischen Aktivität beteiligt sind.
uch die genetischen Grundlagen der ß- Interferonbiosynthese
nd seiner Sensibilität konnten weitgehend geklärt werden. Mit
ilfe von Hybrid- Zellkulturen zeigte Slate (1979), daß Chro-
osom 2 und 5 genetische Informationen zur ß- Interferonbio-
ynthese enthalten. Chany (1981) vermutete dagegen, die ß-
nterferonproduktion werde durch Chromosom 9 gesteuert. Ein-
timmigkeit herrscht jedoch in der Annahme, daß die antivira-
en und antiproliferativen Wirkungen von Interferon durch
hromosom 21 vermittelt werden (Tan 1976, Cupples 1977).

ie Eigenschaften der Interferone kann man grob untergliedern
n antivirale und nicht antivirale. Der antivirale Mechanis-
us beruht auf einer Bindung des Interferons an spezifische,
angliosidähnliche Zelloberflächenrezeptoren (Vengris 1976).
adurch wird die Synthese einer neuen, zellulären m- RNS und
ines spezifischen Proteins induziert (Dianzani 1976, Maurer
979). Dieses antivirale Protein schützt die Zellen, indem
ich dort eingedrungene Viren nicht mehr replizieren können.
omit wirkt Interferon nicht selbst antiviral, sondern ver-
ittelt seine Wirkung ähnlich einem Hormon.

Die immunmodulierenden Eigenschaften von Interferon sind
ntensiv untersucht worden. Gisler (1974) konnte nachweisen,
aß die Antikörperproduktion in vitro durch Interferonzusatz
ehemmt wird, ein dosisabhängiger Effekt. Mit Interferon be-
andelte Makrophagen zeigen eine verstärkte Aktivität bei in
itro- Bedingungen. Sie verhalten sich zytotoxisch gegenüber

Tumorzellen und sind stark vakuolisiert (Schultz 1978). Die Immunreaktion vom verzögerten Typ wird durch Interferon blokkiert, wie De Maeyer 1975 als erster zeigen konnte. Der Einfluß auf Transplantate ist umstritten: Skurkovich (1973) stellte eine Beschleunigung der Abstoßungsreaktion von Maustransplantaten fest, während Mobraaten (1973) von einer signifikant erhöhten Überlebensrate seiner Transplantate berichtete. Die Zytotoxizität sowohl sensibilisierter als auch nicht sensibilisierter Lymphozyten steigt unter Interferon deutlich an (Lindahl 1972, Heron 1976).

Die Artspezifität der Interferone ist nicht, wie früher angenommen, streng ausgeprägt. So übt zum Beispiel menschliches ß- Interferon auch eine gewisse Wirkung auf verschiedene tierische Zellen aus. Stewart (1981) schlug deshalb vor, von einem definierten Wirtsbereich der Interferone zu sprechen.

Knight (1976 b) berichtete, daß die antivirale Aktivität und die zellwachstumshemmende Eigenschaft des ß- Interferons nicht voneinander trennbar sind. Der antiproliferative Effekt aller Interferontypen konnte an gesunden menschlichen und tierischen Zellen sowie an Tumorzellen in vivo und in vitro nachgewiesen werden (u.a. Gresser 1970, Dahl 1976, Stewart 1976, Strander 1977). Balkwill (1978) erklärt die Hemmung der Zellteilung durch verlängerte G_1- und $S+G_2$- Phasen. Menschliches gamma- Interferon soll dabei stärker wirksam sein als alpha- oder ß- Interferon in menschlichen Blutkulturen (Blalock 1980).

Es stellte sich die Frage, ob der antiproliferative Effekt des Interferons auch dann noch vorhanden ist, wenn die Zellen zum Wachstum angeregt werden. Lindahl- Magnusson (1972) behandelte Mauslymphozyten, die durch Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert waren, mit verschiedenen Interferonen und fand eine starke Hemmung der DNS- Synthese. Ein ähnliches Resultat erzielte Blomgren (1974), der menschliche Lymphozyten mit verschiedenen Mitogenen, u.a. PHA, stimulierte und nach Zusatz von alpha- Interferon untersuchte.

hytohämagglutinin (PHA) ist ein Glykoprotein, gewonnen der Bohne phaseolus vulgaris. Nowell (1960) entdeckte, diese Substanz Leukozyten in vitro zum Wachstum anregt. eukozytenkulturen mit PHA kommt es zu einer Transforma- der kleinen Lymphozyten, wobei man unter Transformation Umwandlung eines morphologisch definierten Zelltyps in n anderen ohne zwischengeschaltete Zellteilung versteht. morphologischen Veränderungen der kultivierten Lympho- n beschrieb u.a. Elves (1972): 24 Stunden nach der Sti- ation finden sich mittelgroße, lymphoide Zellen, deren e aufgelockert sind und deren Zytoplasma vermehrt er- eint. Nach 48 Stunden sieht man große, blastenartige lym- tische Zellen mit nucleolenhaltigen, lockeren Kernen und g bis stark vergrößertem Zytoplasmasaum. Diese Immuno- sten zeigen häufig Mitosen und beherrschen an den folgen- Kulturtagen das Bild. Entfernt man das Mitogen aus der ur, so dominieren nach einer Woche wieder die kleinen hozyten (Polgar 1968).

Ein weiteres Pflanzenmitogen ist das Pokeweed- Mitogen 1), ein Extrakt aus phytolacca americana (Farnes 1964). erschiede in der Lymphozytenstimulation zu PHA (Eridiani 9) erklärte man mit einer Wirkung der Mitogene auf ver- edene Lymphozytenpopulationen. Die Lymphozyten unterglie- n sich in T- Zellen (thymus derived) und in B- Zellen rsa equivalent derived) (Roitt 1969), wobei die T- 60% 80% und die B- Zellen 10% bis 30% einer normalen Blut- ulation beim Menschen ausmachen. Die T- Lymphozyten ver- teln die zellgebundene Immunität, während die B- Lympho- en die humorale Abwehr steuern, indem sie Antikörper ins um abgeben. PHA betrachtet man als T- Zell- Stimulator, als vorwiegendes B- und teilweise T- Zell- Stimulans uglas 1971, Mendes 1974). Beide Mitogene bewirken eine pezifische Stimulierung, d.h. sie üben einen mitogenen z aus, ohne daß eine immunologische Sensibilisierung angegangen ist.

Nach diesen kurzen Ausführungen über Interferon, PHA und PWM interessiert weiterhin die Frage, ob ß- Interferon an menschlichen Blutkulturen auch dann eine Wirkung erzielt, wenn diese durch PHA und PWM stimuliert werden. Andere Untersucher, die sich mit einer ähnlichen Fragestellung beschäftigten, benutzten eine von unserer verschiedene Methode (u.a. Lindahl-Magnusson 1972) oder arbeiteten mit anderen Interferontypen (u.a. Blomgren 1974). Wir verwendeten Blutkulturen von gesunden Probanden und setzten handelsübliches ß- Interferon aus menschlichen Fibroblasten in steigenden Konzentrationen zu, um mögliche Effekte auf ihre Dosisabhängigkeit zu überprüfen. Unser besonderes Interesse galt einer etwaigen Veränderung der Umwandlungsrate in Immunoblasten und der Mitoserate während der Stimulierung der Kulturen unter ß- Interferon.

. Material und Methodik

s der vena cubiti wurde mit einer 20ml Spritze, die zuvor t Heparin (Liquemin-Originallösung) benetzt war, Blut abge- mmen. Nach mehrstündiger Inkubation bei 37°C in einem steri- n 50ml Kolben wurde das überstehende Plasma abpipettiert und t RPMI- Medium 1640 auf 10 ml aufgefüllt. Dem Ansatz wurde n Tropfen einer 0,9%igen Kochsalzlösung zugesetzt, die pro 0 ml 10 mg Streptomycin und Binotal enthielt, und zwei Trop- n Phytohämagglutinin (1:15) bzw. Pokeweed- Mitogen (1:10). eichzeitig wurde ß- Interferon in verschiedenen Konzentra- onen zugegeben (50 U/ml, 500 U/ml, 5000 U/ml). Die Leuko- tensuspension wurde anschließend in 2ml- Eppendorfreaktions- fäßen bei 37°C inkubiert.

Aus dem Originalansatz sowie am 3. und 5. Kulturtag wurden weils 2 Proben entnommen und bei 500 Umdrehungen 10 Minuten ng zentrifugiert. Die Färbung der Ausstriche erfolgte nach ppenheim:

Der luftgetrocknete Ausstrich wird mit May- Grünwald- Lösung übergossen,
mit aqua dest. nach 3 Minuten abgespült,
auf 1/5 verdünnte Giemsa- Lösung aufgegossen und
nach 5 Minuten mit aqua dest. abgespült und getrocknet.

Zur Zelldifferenzierung und -zählung verwendeten wir ein chtmikroskop mit dem Okular 10x und dem Ölimmersionsobjektiv 0x. Es wurden möglichst 500 Zellen pro Kulturtag differen- ert. Die Durchmusterung der Präparate erfolgte mäanderförmig.

e morphologischen Charakteristika der gefundenen Zellen efinierten wir wie folgt:

er Lymphzyt hat einen runden, manchmal gebuchteten Kern mit robscholligem, dichtem Chromatin. Das Zytoplasma erscheint

meist als nur dünner, kräftig hellblauer Randsaum, manchmal enthält es azurophile Granula. Mitosen findet man nicht.

Der stimulierte Lymphozyt bildet eine Zwischenform zwischen Immunoblasten und Lymphozyten. Sein Kern erscheint netzig und ist schwächer anfärbbar. Vereinzelt finden sich kleine Nucleoli. Das Zytoplasma ist hellblau und im Vergleich zum Lymphozyten vermehrt. Mitosen sind selten.

Der Immunoblast ist eine große, runde Zelle. Sein scharf begrenzter Kern (Durchmesser10 mikrom.) enthält netziges, fein strukturiertes Chromatin und mindestens einen großen Nucleolus. Das Zytoplasma ist hellblau bis stark basophil und enthält oft Vakuolen. Manchmal findet man perinucleäre Aufhellungen und rötliche Granula. Mitosen beobachtet man häufig.

Der Granulozyt zeigt verschiedene Kernformen: Der phylogenetisch jüngere Stabkernige hat einen langgezogenen, hufeisenförmigen Kern, während der Segmentkernige über 2 bis 5 Chromatinstücke verfügt, die durch dünne Fäden miteinander verbunden sind. Der neutrophile Granulozyt ist nach seinen hellen, neutrophilen Granula benannt, sein Zytoplasma erscheint oxyphil. Der basophile Granulozyt wird durch seine reichlichen, dunkel- violetten Granula charakterisiert, und der eosinophile durch seine gelblich- orangenen. Der Kern des letzteren besteht aus 2 Segmenten, die Chromatin mit einer zarten, lockeren Struktur enthalten.

Der Monozyt kann eine runde oder oval gebuchtete Form annehmen. Das Zytoplasma ist rauchblau und zeigt vereinzelt feine, rotviolette Granula. Der rotviolette Kern nimmt sowohl gebuchtete als auch gelappte oder stabartige Formen an.

Der Makrophage ist eine große Zelle (Durchmesser 20 bis 50 mikrom.) mit vielen Erscheinungsformen. Meist enthält der unscharf begrenzte, kleine rundliche Kern verknäultes Chromatin, und das blaß- blaue Zytoplasma reichlich Vakuolen. Die Kern-Plasma- Relation ist im Gegensatz zu allen anderen entstandenen Zellen sehr niedrig (unter 0,3).

Als Blutspender dienten 4 gesunde, junge Probanden beiderlei Geschlechts. Von allen wurden

a) Blutkulturen angesetzt, die ausschließlich mit steigenden ß- Interferonkonzentrationen behandelt wurden,
b) Blutkulturen mit PHA- Zusatz und steigenden ß- Interferonkonzentrationen und
c) Blutkulturen mit PWM- Zusatz und steigenden ß- Interferonkonzentrationen.

Jede Kultur wurde am 3. und am 5. Tag ausgewertet, insgesamt waren 90 Kulturen zu differenzieren. Der 0. Tag Zytozentrifuge diente als Ausgangswert.

Zur Auswertung der Ergebnisse wurden folgende Indices errechnet:

a) Der Immunoblastenindex (IBL-I)

$$\text{IBL-I} = \frac{\text{Immunoblasten in \%}}{\text{Lymphozyten des Originalausstrichs in \%}}$$

Dieser Index gibt das zahlenmäßige Verhältnis zwischen Immunoblasten in der Kultur und Ausgangslymphozyten an. Wir verwendeten zur Berechnung die Zellzahlen in % und erhielten so den relativen IBL-I.

b) Der Mitoseindex (MI)

$$\text{MI} = \frac{\text{absolute Mitosenzahl}}{\text{absolute Immunoblastenzahl}}$$

Dieser Index zeigt das Verhältnis von Mitosehäufigkeit zur Anzahl mitosefähiger Zellen, den Immunoblasten, auf. Die Berechnung erfolgte mit absoluten Zahlen.

Die statistische Auswertung des Mitoseindex führten wir mit dem Chi^2- Verfahren durch. So konnten wir entscheiden, ob Abweichungen zwischen Kontroll- und Zusatzkultur signifikant im Sinne der Statistik sind. Unter Berücksichtigung der Freiheitsgrade wurden aus logarithmischen Kurven die Wahrscheinlichkeitswerte p abgelesen. Ein Ergebnis ist signifikant, wenn

p kleiner als 0,01 ist. Weitere Erklärungen zu dieser Methode bietet u.a. Fuchs (1969).

Das für die vorliegende Arbeit verwendete, frei verkäufliche Interferonpräparat wird von Dr. Rentschler Arzneimittel in Laupheim hergestellt und heißt Fiblaferon L. Aufgrund seines niedrigen Reinheitsgrades von 1 x 10^5 I.E. und seiner Pyrogenität ist Fiblaferon L nur für Versuche an Zellkulturen geeignet, nicht aber am Menschen.
Dieses ß- Interferon wird von diploiden FS4- Zellen produziert nach Induktion mit der synthetischen, doppelsträngigen Polyinosin- Polycytosinsäure (PolyI:C) und Superinduktion mit Cycloheximid und Actinomycin D. Die Interferon enthaltenden Zellüberstände werden mit Perchlorsäure gefällt, unter aseptischen Bedingungen chromatographisch gereinigt und nach 2-facher Sterilfiltration gefriergetrocknet. Die Aktivität des Fiblaferon L wird mit Hilfe eines standardisierten biologischen Tests ermittelt. Dieser Test erfaßt die Hemmung des zytopathischen Effekts, hervorgerufen durch das Virus der vesikulären Stomatitis (VSV). Eine Einheit wird als diejenige Menge Interferon definiert, die 50% des Zellrasens einer Indikatorkultur vor der Lyse durch VSV bewahrt.

I. Ergebnisse

Auswertung der mit PHA stimulierten Kulturen

rwendete Abkürzungen:

A 0 = Phytohämagglutinin ohne β- Interferonzusatz
A 50 = PHA + 50 U/ml β- Interferon
A 500 = PHA + 500 U/ml β- Interferon
A 5000 = PHA + 5000 U/ml β- Interferon
= Mittelwerte der Messungen, dicke Striche
. = Lymphozyten
. Ly. = stimulierte Lymphozyten
L. = Immunoblasten
= Proband C.K., weiblich
= Proband H.B., männlich
= Proband E.K., männlich
= Proband H.Y., weiblich

Abb.1-4 sind auf der Ordinate die relative Anzahl von Ly. + . Ly. bzw. von IBL. aufgetragen gegen die steigenden Fibla-eronkonzentrationen (50, 500, 5000 U/ml) auf der Abszisse. wohl die vier einzelnen Versuche (x_1-x_4) als auch die Mit-elwerte (m) der PHA- stimulierten Kulturen werden dargestellt. den β- Interferoneinfluß beurteilen zu können, stellten wir en Interferonbehandelten PHA- Kulturen reine PHA- Kulturen ne Zusatz gegenüber. Die Auswertung erfolgte am 3. und 5. ulturtag.

Am 3. Kulturtag erkennt man in Abb.1 bei niedrigen (50 U/ml) - Interferonkonzentrationen im Mittel ein leichtes Absinken er Ly. + st. Ly. Bei 500 und 5000 U/ml verändern sich die erte im Vergleich zur Kontrolle kaum. Gegenläufig verhalten ich die dazugehörenden IBL.zahlen (Abb.2). Bei 50 U/ml stei-en die IBL. schwach an, bei 5000 U/ml wird der Wert der ontrollkultur in etwa gehalten.

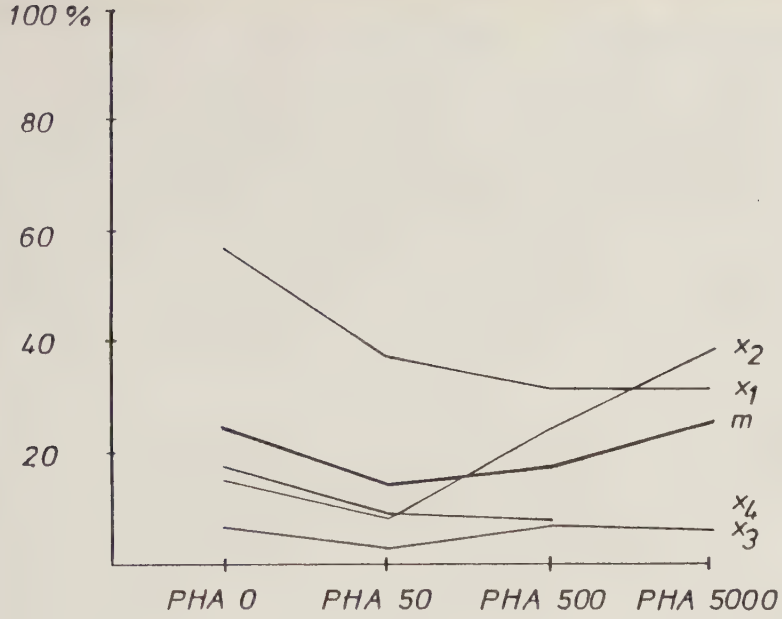


Abb.1: relat. Zahlen von Ly.+st.Ly. in PHA- Kultur, 3. Tag

— Mittelwert — einzelne Probanden

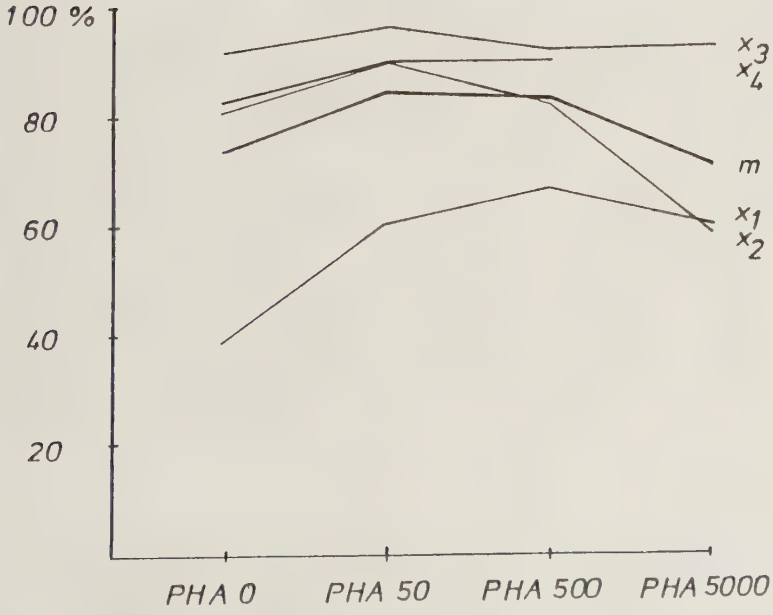


Abb.2: relat. Zahlen von IBL in PHA- Kultur, 3. Tag

— Mittelwert — einzelne Probanden

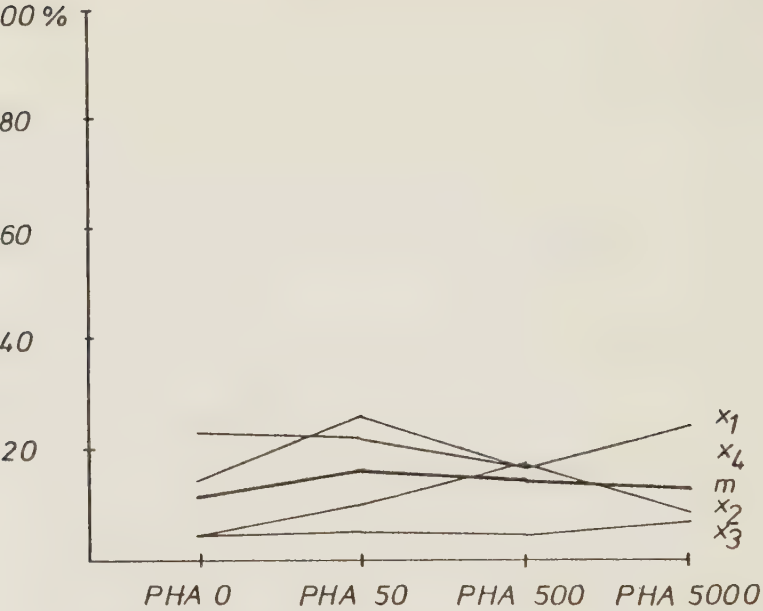
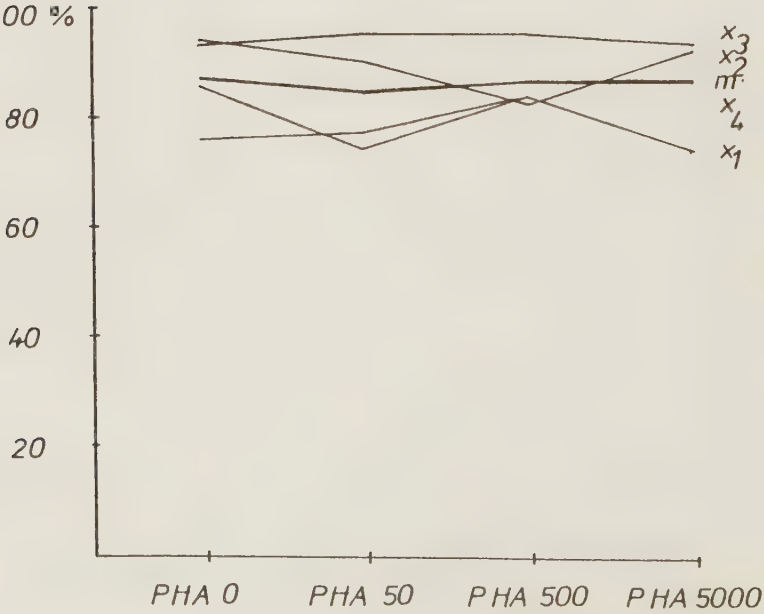


Abb.3: relat. Zahlen von Ly.+st.Ly. in PHA- Kultur, 5. Tag

— Mittelwert — einzelne Probanden



Ähnliche Ergebnisse bietet der 5. Kulturtag: Abb.3 demonstriert gleichbleibende Ly. + st. Ly.zahlen bei steigenden β- Interferonkonzentrationen im Vergleich zur Kontrolle. Auch die Anzahl der IBL. (Abb.4) ändert sich durch unterschiedliche Kulturbedingungen nicht.

Somit bewirkt β- Interferon keine Abweichungen bei den Zahlenverhältnissen der Ly. + st. Ly. gegen IBL. im Vergleich zur PHA- Kontrollkultur, weder am 3. noch am 5. Kulturtag.

Die Aufzeichnung der relativen IBL.- Indices vom 3. PHA-Kulturtag (Abb.5) zeigt, daß x_1 mit zunehmenden Interferonkonzentrationen leicht ansteigt, x_2 dosisabhängig abfällt und $x_{3,4}$ kaum Schwankungen im Vergleich zur Kontrolle bieten.

Die IBL.- Indices der einzelnen Versuche am 5. Kulturtag (Abb.6) demonstrieren trotz verschiedener Ausgangsniveaus der Indices in der PHA- Kultur, daß sie sich unter den steigenden Interferonzusätzen nicht verändern. Abb.7 zeigt die Mittelwerte, die von einem recht gleichförmigen Verlauf der IBL.-Indices an den beiden ausgezählten Kulturtagen zeugen. Sie pendeln zwischen 1,8 und 2,1, unberührt von der Höhe der Interferoneinheiten im Medium. Eine Zusammenstellung der relativen und absoluten IBL.- Indices findet sich in Tab.1 im Anhang.

Damit ist festzuhalten, daß β- Interferon in verschiedenen Konzentrationen keinen Einfluß ausübt auf das Verhältnis zwischen PHA- stimulierten IBL. und den Lymphozyten, weder am 3. noch am 5. Kulturtag. Dieses Ergebnis entspricht den Aussagen, die man Abb.1-4 entnehmen konnte. Die relativen Ly.- und IBL.zahlen ändern sich nicht im Vergleich zu Interferonlosen Kulturen, ebensowenig die IBL.- Indices. Daraus kann man folgern, daß die IBL.- Entstehung durch β- Interferon nicht beeinträchtigt wird.

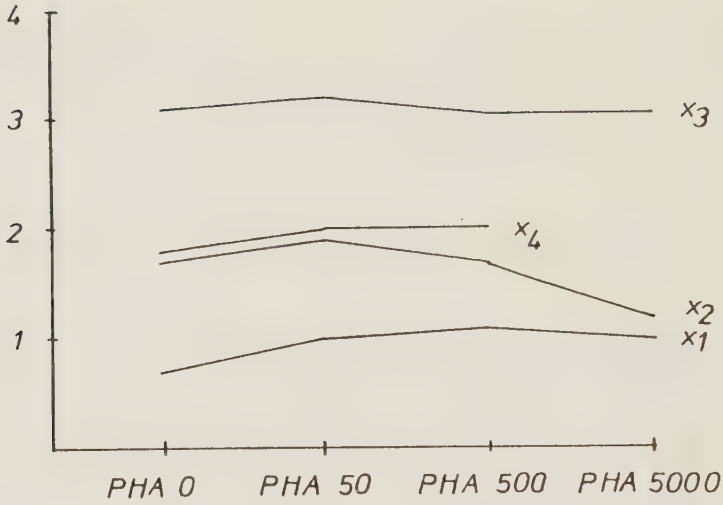
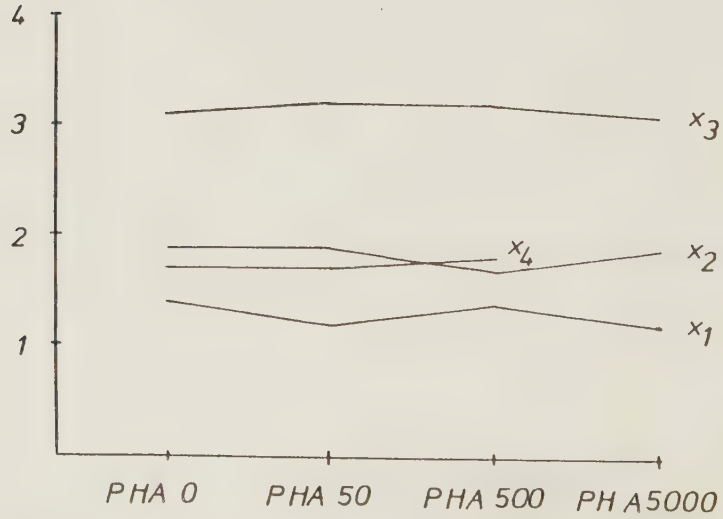


Abb.5: relat. IBL- Indices der PHA- Kultur, 3. Tag
— einzelne Probanden



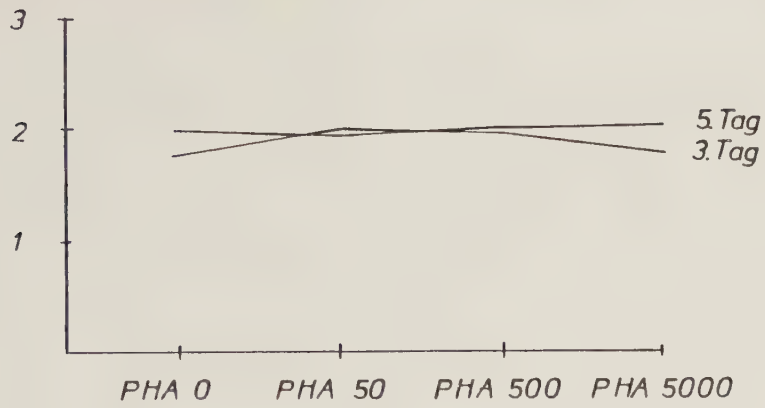


Abb.7: Mittelwerte der relat. IBL- Indices der PHA-Kultur, 3. und 5. Tag

Betrachten wir noch das Zahlenverhältnis zwischen Ly. und st.Ly. unter ß- Interferoneinfluß: Am 3. Kulturtag fallen sowohl die Ly. als auch die st.Ly. im Mittel bei 50 U/ml etwa gleich stark, während bei höheren Interferonzusätzen die Abnahme geringer ist, die Werte aber weiterhin parallel verlaufen (Abb.8). Ein ähnliches Bild bietet sich am 5. Kulturtag (Abb.9), an dem mit Ausnahme von PHA 50 das Verhältnis von Ly. zu st.Ly. etwa konstant bleibt. Wegen der zunehmenden Degeneration ist ihr relativer Anteil am Gesamtzellvolumen geringer als am 3. Kulturtag.

Aus den beiden Grafiken ergibt sich, daß ß- Interferon die Relation zwischen Ly. und st.Ly. mit einer Ausnahme nicht verschiebt, also auch hier keine Beeinträchtigung der Lymphozytenstimulation zu beobachten ist.

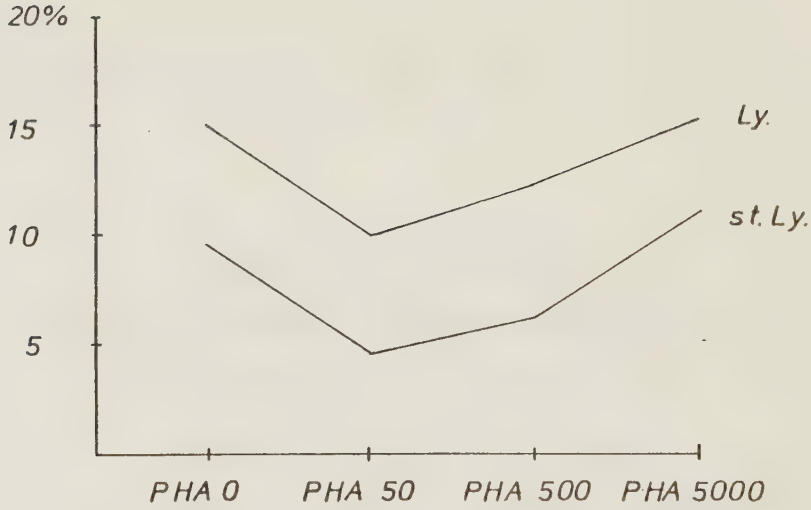


Abb.8: Mittelwerte der relat. Zahlen von Ly. und st.Ly. in PHA- Kultur, 3. Tag

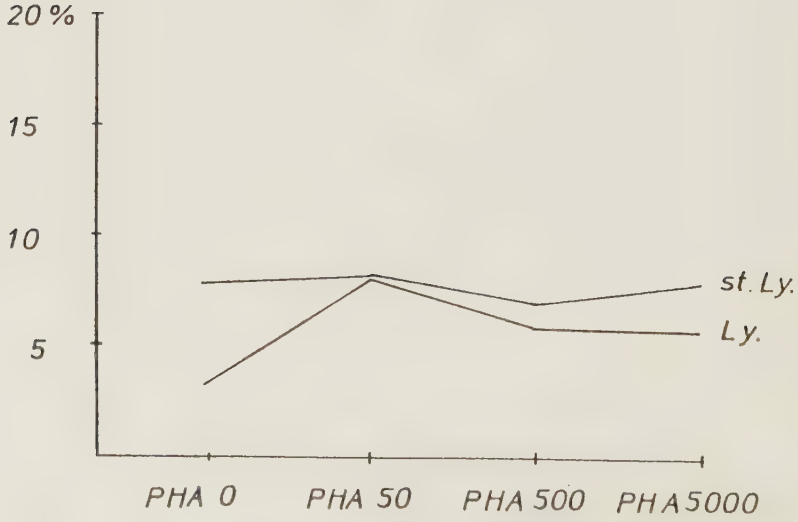


Abb.9: Mittelwerte der relat. Zahlen von Ly. und st.Ly. in PHA- Kultur, 5. Tag

Die Mittelwerte der Mitoseindices werden in Abb.10 dargestellt in Abhängigkeit von PHA und den ß- Interferonkonzentrationen. Am 3. Kulturtag zeigt sich ein starker Abfall des Index von 42°/oo bei alleinigem PHA- Zusatz auf 14°/oo bei PHA + 50 U/ml ß- Interferon. Dieser um 28°/oo niedrigere Mitoseindex wird bei PHA 500 gehalten, sinkt bei PHA 5000 weiter auf 2,5°/oo. Insgesamt fällt der Mitoseindex von PHA 0 zu PHA 5000 um 39°/oo. Die Signifikanzberechnung nach dem Chi^2- Test ergab, daß sowohl der Indexabfall a) von PHA 0 zu PHA 50 als auch b) von PHA 0 zu PHA 500 und c) von PHA 0 zu PHA 5000 ein signifikantes Ergebnis repräsentiert. Der Wahrscheinlichkeitswert p betrug für a) 0,009, für b) 0,0027 und für c) 0,003 (Tab.2).

Die starke Abnahme der Mitosehäufigkeit korreliert mit den steigenden ß- Interferonkonzentrationen. Trotz gleichzeitiger Stimulierung der Kulturen durch das Mitogen PHA wird die Vermehrung der IBL. am 3. Tag deutlich gehemmt. Der Zusatz von 500 U/ml verstärkte die Wirkung auf den Mitoseindex nicht. Die in den Versuchen beobachtete Dosisabhängigkeit konnte durch die Signifikanzberechnung nicht bestätigt werden (Tab.3).

Nach 5 Kulturtagen ist ein Abfall des Mitoseindex nicht deutlich zu beobachten. Zwar sinkt der Index von PHA 0 zu PHA 50 um 9°/oo, doch ist das Ergebnis nicht signifikant (p= 0,12). Bei höheren Interferonkonzentrationen fallen die Werte noch schwächer ab und sind auch nicht signifikant. Dies liegt am niedrigen Ausgangswert der Kulturen ohne Interferon, d.h. die Stimulation der Mitoseaktivität durch PHA hat sowieso schon stark nachgelassen.

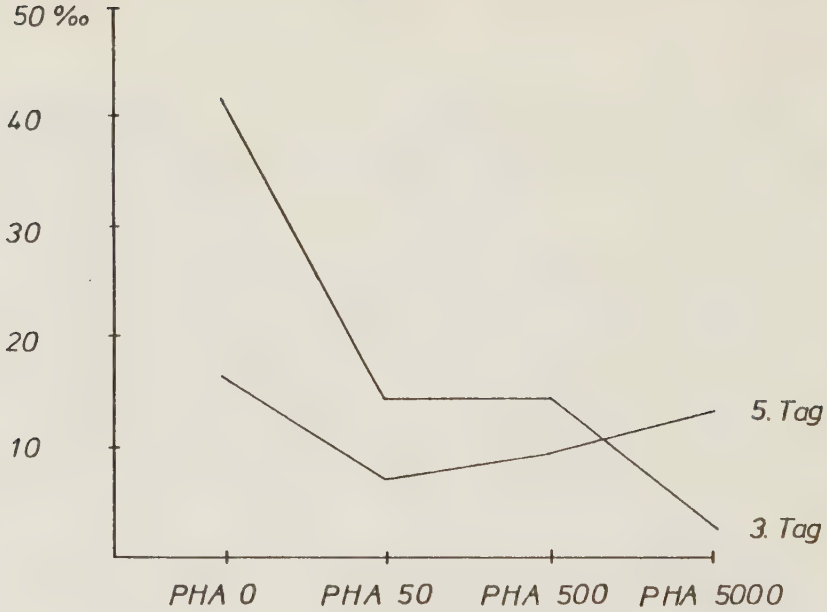


Abb.10: Mittelwerte der Mitoseindices in PHA-Kultur, 3. und 5. Tag

B Auswertung der mit PWM stimulierten Kulturen

Verwendete Abkürzungen:
PWM 0 = Pokeweed- Mitogen ohne β- Interferonzusatz
PWM 50 = PWM + 50 U/ml β- Interferon
PWM 500 = PWM + 500 U/ml β- Interferon
PWM 5000= PWM + 5000 U/ml β- Interferon
weitere Abkürzungen siehe A

Abb.11-14 beinhalten die relative Anzahl von Ly.+st.Ly. und dazugehörigen IBL. am 3. und 5. Kulturtag in PWM- Kultur. Die Zellzahl in Prozent ist gegen die einfache PWM- Kultur und die mit steigenden β- Interferonkonzentrationen (50, 500, 5000 U/ml) aufgetragen.

Am 3. Kulturtag steigen die Lymphozytenzahlen im Mittel unter Interferon leicht an im Vergleich zur Kontrolle (Abb.11). Die IBL. zeigen gegenläufig dazu eine schwache Abnahme (Abb. 12). Der 5. Kulturtag bietet ein ähnliches Bild: In Abb.13 sieht man einen leichten Ly.+st.Ly.- Zuwachs bei zunehmenden β- Interferondosen, während die IBL. in Abb.14 im Vergleich zur Kontrollkultur bei 50 U/ml etwas stärker, bei 500 und 5000 U/ml weniger ausgeprägt reduziert sind.

Festzuhalten ist, daß β- Interferon den prozentualen Anteil von Ly.+st.Ly. und von IBL. in PWM- stimulierten Kulturen im wesentlichen unbeeinflußt läßt, wie schon für die PHA- Kulturen festgestellt.

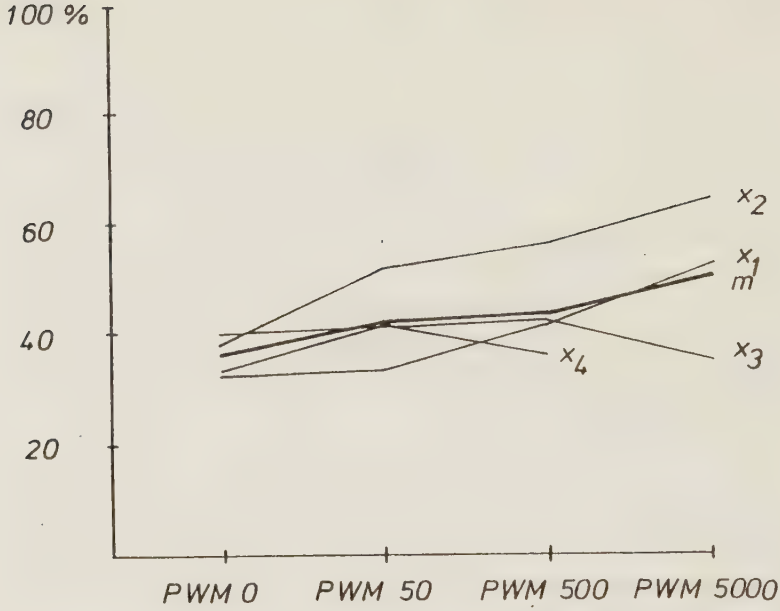


Abb.11: relat. Zahlen von Ly.+st.Ly. in PWM- Kultur, 3.T
— Mittelwert — einzelne Probanden

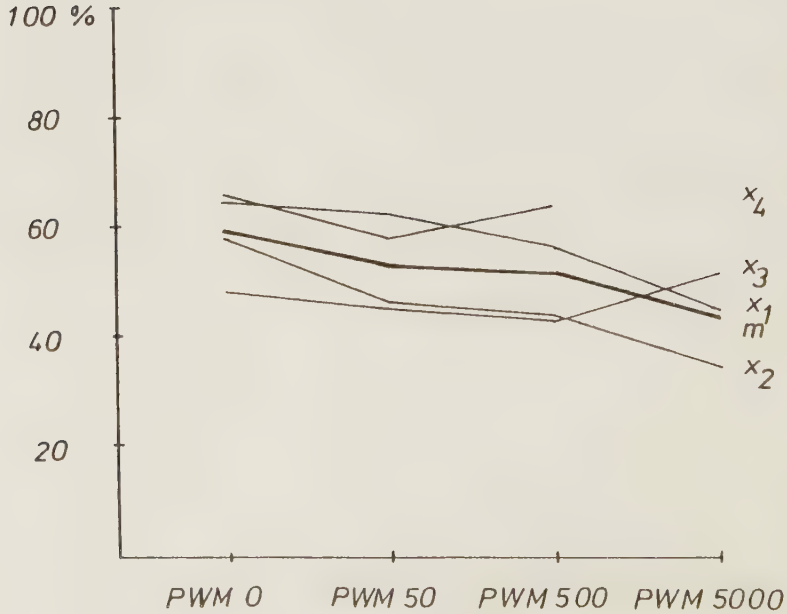


Abb.12: relat. Zahlen von IBL. in PWM- Kultur, 3.Tag
— Mittelwert — einzelne Probanden

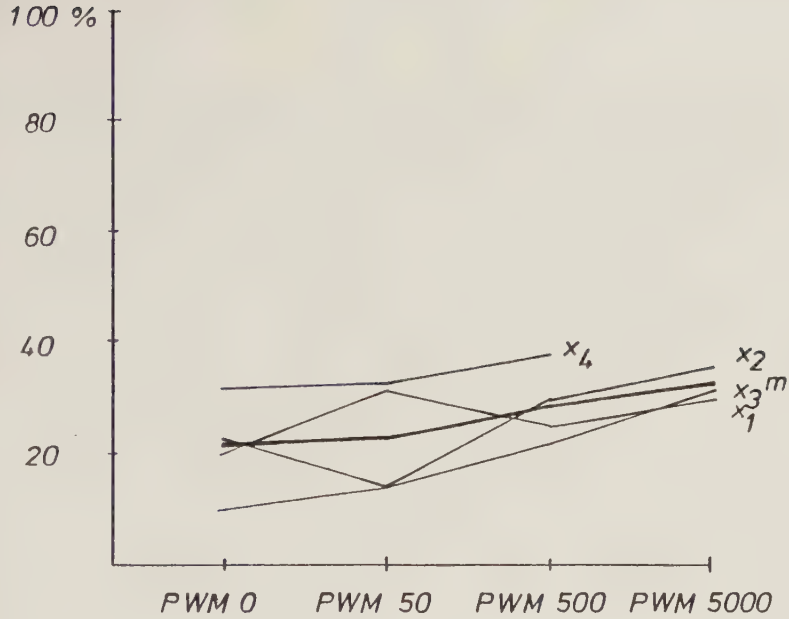


Abb.13: relat. Zahlen von Ly.+st.Ly. in PWM- Kultur, 5.Tag
— Mittelwert — einzelne Probanden

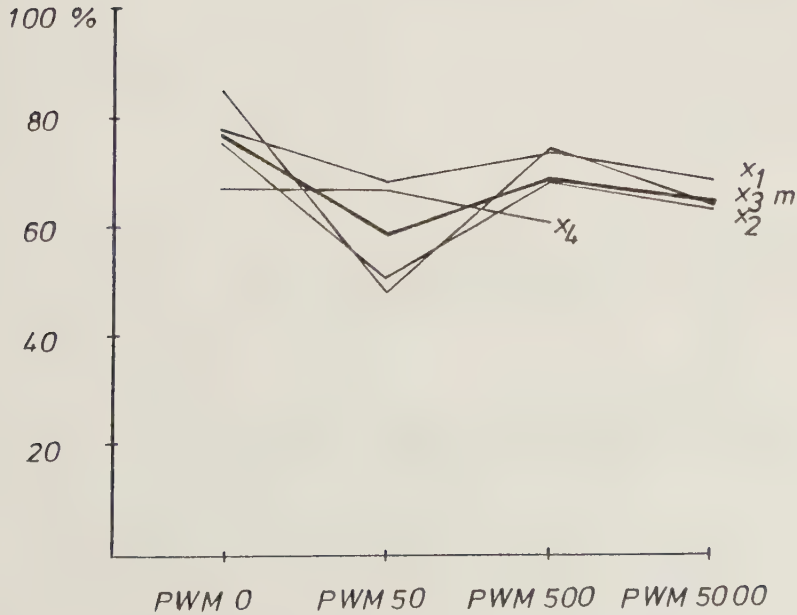


Abb.14: relat. Zahlen von IBL. in PWM- Kultur, 5.Tag
— Mittelwert — einzelne Probanden

Abb.15 stellt die relativen IBL.- Indices des 3. Kulturtages dar. Während die Werte von 2 Kulturen ($x_{1,2}$) mit wachsenden Interferonkonzentrationen schwach fallen, steigt x_4 bei PWM 500 und x_3 bei PWM 5000 etwas an. Die Mittelwerte (Abb.17), die zwischen 1,3 und 1,05 liegen, demonstrieren die Wirkungslosigkeit verschiedener ß- Interferonzusätze.

Am 5. Kulturtag bietet sich ein ähnliches Bild (Abb.16): Die Werte von x_3 schwanken kräftig in den einzelnen Konzentrationen, die übrigen Verläufe sind jedoch recht gleichförmig. Somit sieht man auch in Abb.17 keine deutlichen Veränderungen der Mittelwerte, die am 5. Tag zwischen 1,3 und 1,8 pendeln.

In Tab.1 im Anhang erfolgte eine Zusammenstellung der relativen und absoluten IBL.- Indices von PWM- Kulturen am 3. und 5. Tag.

Als Ergebnis kann man festhalten, daß in PWM- Kulturen das Verhältnis von IBL. zu den Ausgangslymphozyten durch ß- Interferon nicht modifiziert wird, ähnlich wie in den PHA- Kulturen (Abb.7).

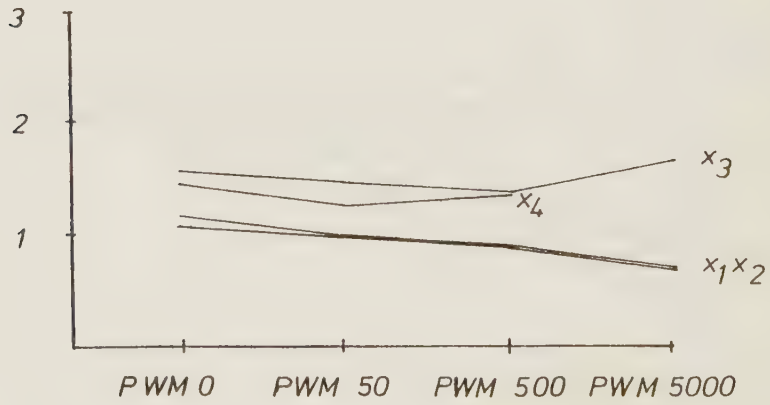


Abb.15: relat. IBL.- Indices in PWM- Kultur, 3. Tag

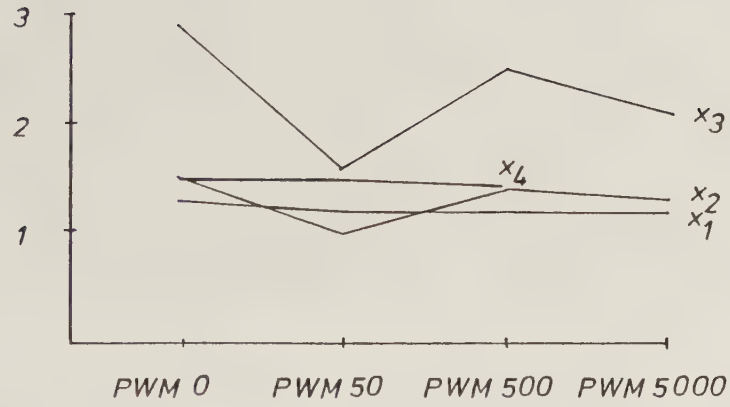


Abb.16: relat. IBL.- Indices in PWM- Kultur, 5. Tag

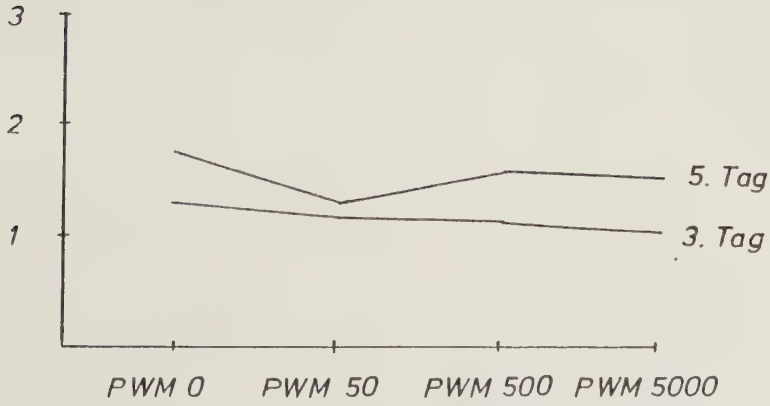


Abb.17: Mittelwerte der IBL.- Indices in PWM- Kultur, 3. und 5. Tag

Abb.18 zeigt die Mittelwerte der relativen Zahlen von Ly. und st.Ly. am 3. PWM- Kulturtag. Mit steigenden ß- Interferondosen finden sich mehr Lymphozyten, die st.Ly. nehmen mit Ausnahme von PWM 500 parallel zu. Auch in der PHA- Kultur des 3. Tages (Abb.8) sah man parallel verlaufende Zellzahlen, die sich im Gegensatz zur PWM- Kultur verminderten.

Am 5. Kulturtag (Abb.19) verändert sich der Prozentsatz von st.Ly. kaum, die Ly. dagegen steigen deutlich an.

Somit kann auch in dieser Versuchsanordnung kein Einfluß auf die Stimulation durch ß- Interferon nachgewiesen werden.

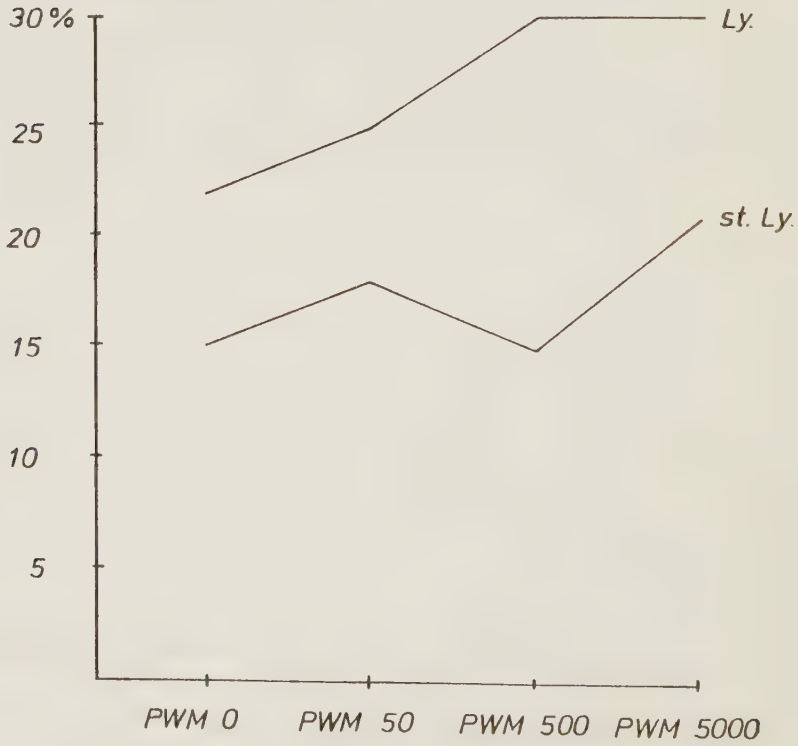


Abb.18: Mittelwerte der relat. Zahlen von Ly. und st.Ly. in PWM- Kultur, 3. Tag

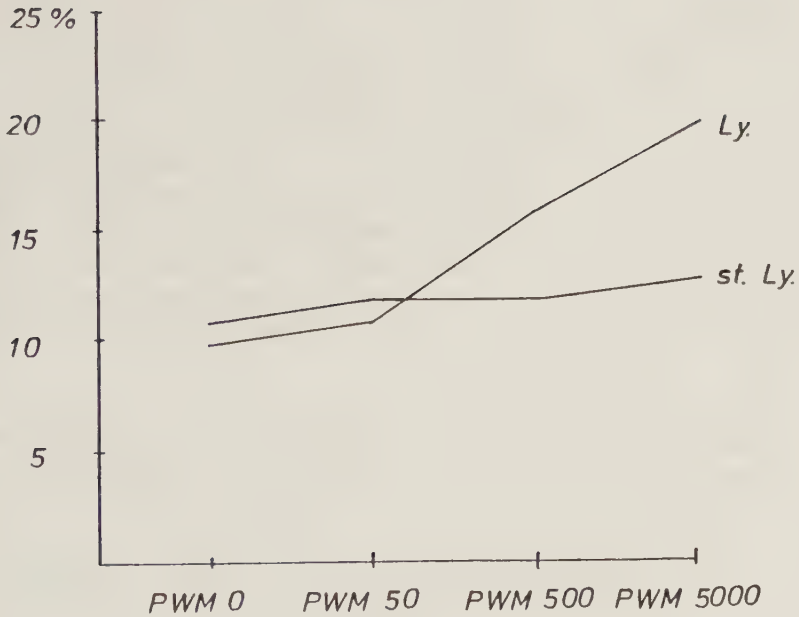


Abb.19: Mittelwerte der relat. Zahlen von Ly. und st.Ly. in PWM- Kultur, 5.Tag

Die Mittelwerte der Mitoseindices der beiden PWM- Kulturtage stellt Abb.20 dar. Am 3. und 5. Tag entdeckt man einen Abfall des Index von PWM 0 zu PWM 50, der jedoch nicht signifikant ist (3. Tag: p= 0,48; 5. Tag: p= 0,58). Auch das Absinken um 14°/oo von PWM 0 zu PWM 500 am 5. Tag bedeutet kein signifikantes Ergebnis (p= 0,09). Die übrigen Werte fallen noch weniger ab und sind auch nicht signifikant (Tab.4, Anhang).

Dieses Resultat ist mit dem des 5. PHA- Kulturtages (Abb.8) zu vergleichen, bei dem die Mitoseindices trotz fallender Werte keine statistische Signifikanz erreichten.

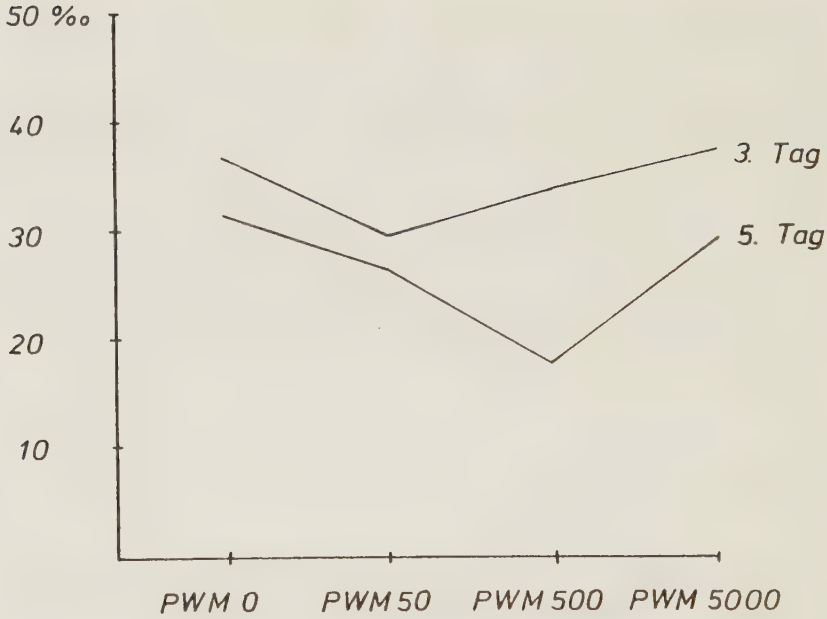


Abb.20: Mittelwerte der Mitoseindices in PWM-Kultur, 3. und 5. Tag

C Auswertung der unstimulierten Blutkulturen

Verwendete Abkürzungen:
BK 0 = Blutkultur ohne β- Interferonzusatz
BK 50 = BK + 50 U/ml β- Interferon
BK 500 = BK + 500 U/ml β- Interferon
BK 5000 = BK + 5000 U/ml β- Interferon
weitere Abkürzungen siehe A

Abb.21 gibt einen Überblick über die Mittelwerte der relativen Lymphozytenzahlen inklusive stimulierter Lymphozyten, die in unstimulierten Blutkulturen am 3. und 5. Tag mit und ohne β- Interferonzusatz gefunden wurden. Die Ly.- Prozentzahlen in der unbehandelten BK steigen im Vergleich zum Originalausstrich an beiden Tagen an durch die Degeneration der Segmentkernigen. Ein weiterer Zuwachs gegen die Interferonlose Kontrollkultur ist bei allen β- Interferonkonzentrationen zu beobachten. Am 5. Tag ist die relative Ly.zahl niedriger als am 3. Tag in der einfachen BK, ebenso nach 50 und 500 U/ml Interferonzusatz. Der Gesamtanstieg ist am 5. Kulturtag stärker als am 3., steigt bei 5000 U/ml sogar über die Werte des 3. Tages.

Die Abb.22 stellt die relativen Makrophagenzahlen in den verschiedenen BK dar. Während im Originalausstrich keine vorhanden sind, fanden wir am 3. Tag der Interferonlosen BK im Mittel 20%, am 5. Tag 35%. Mit steigendem Interferonzusatz ist ihre Anzahl geringer. Die Kulturen des 3. Tages verlieren von BK 0 zu BK 5000 8% Makrophagen, BK 5000 enthält nur noch 12% dieser Zellen. Der 5. Tag zeigt mit mehr entstandenen Makrophagen ohne Interferon die Tendenz noch deutlicher: Der Unterschied von BK 0 zu BK 5000 beträgt 24%, in BK 5000 finden sich auch am 5. Tag nur 11% Makrophagen. Die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen scheint mit steigenden β- Interferonkonzentrationen nicht wie üblich zu funktionieren.

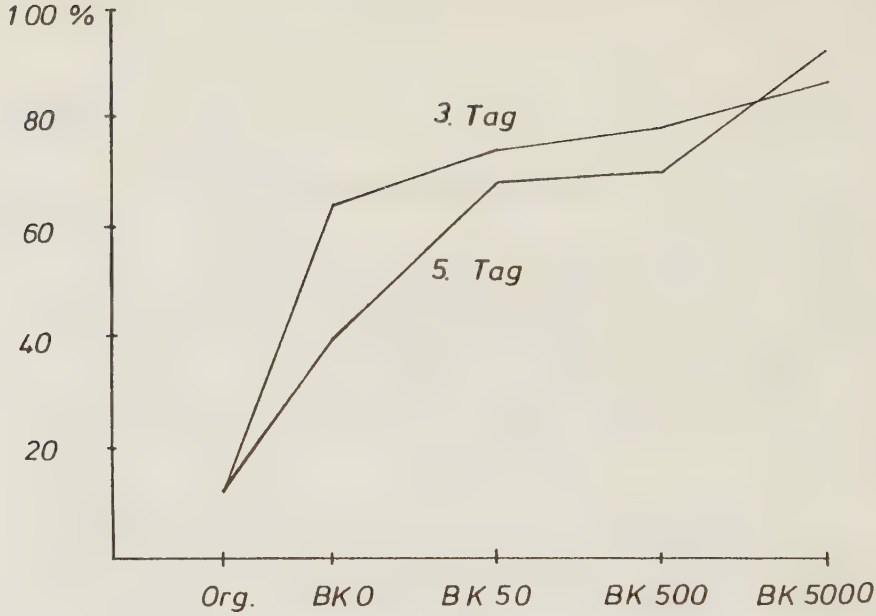


Abb.21: Mittelwerte der relat. Ly.zahlen in BK, 3. und 5. Tag

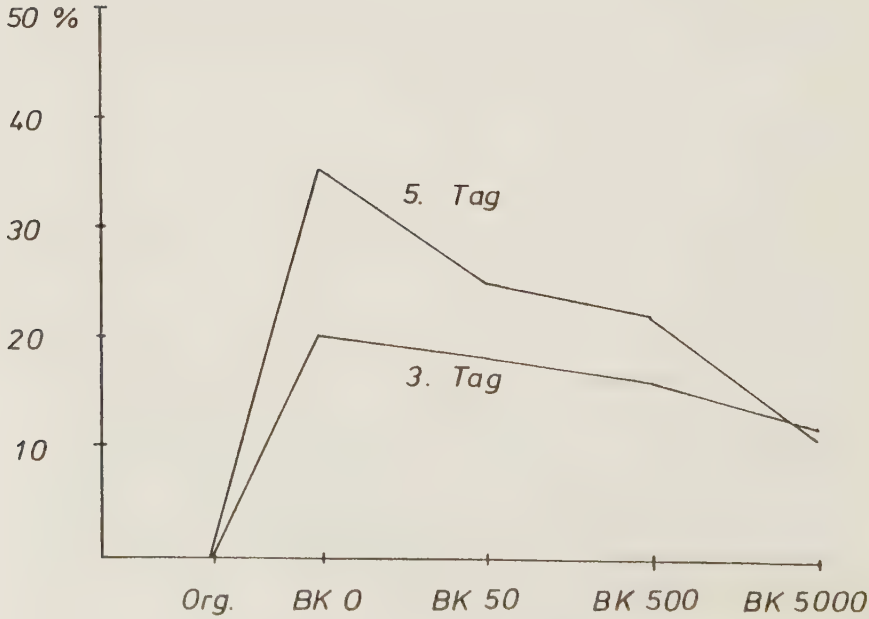


Abb.22: Mittelwerte der relat. Makrophagenzahlen in BK, 3. und 5. Tag

Die deutlich dosisabhängige Verminderung von Makrophagen durch Interferon wirft die Frage auf, wie sich die Monozyten verhalten. Abb.23 zeigt, daß in BK 0 weniger Monozyten als im Original vorhanden sind und sich die relative Anzahl bis zum 5. Kulturtag kaum geändert hat. Am 5. Kulturtag sinkt die Monozytenzahl unter 0- Interferon etwas mehr als am 3. Tag, die Abnahme ist insgesamt jedoch gering.

Die Granulozyten, die im Originalausstrich 42% des Zellvolumens ausmachen, sind schon in BK 0 durch Degenerationsvorgänge stark dezimiert (Abb.24). Mit zunehmenden Interferonkonzentrationen sinken sie weiter leicht ab, am 5. Tag deutlicher.

Mitosen konnten wir in den BK mit und ohne Interferon nicht beobachten. Morphologisch waren keine Unterschiede zu den Kontrollkulturen festzustellen. Die Mittelwerte der bisher ungenannten, in den Originalen gefundenen Zellarten sind: 0,16% Myelozyten, 3,4% Stabkernige, 35,8% Segmentkernige, 1% eosinophile und 1,8% basophile Segmentkernige.

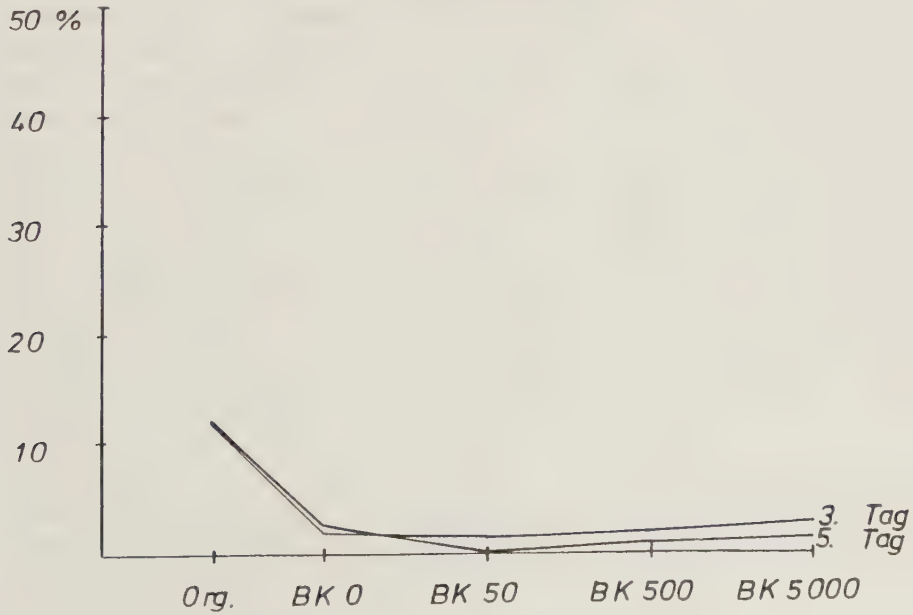


Abb. 23: Mittelwerte der relat. Monozytenzahlen in BK, 3. und 5. Tag

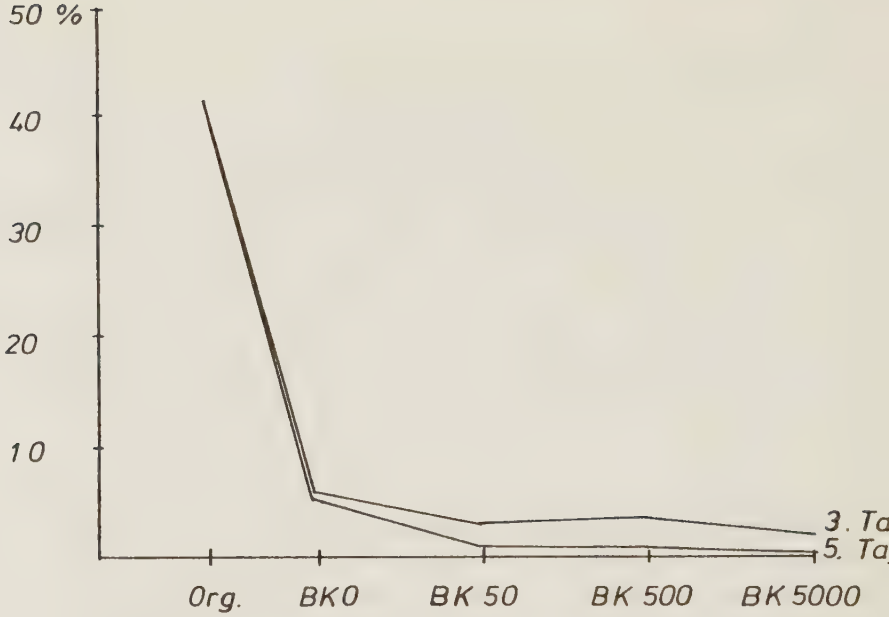


Abb.24: Mittelwerte der relat. Granulozytenzahlen in BK, 3. und 5. Tag

IV Diskussion

A stimulierte Blutkulturen

Über eine Eigenschaft des Interferons, die antiproliferative Wirkung auf Zellen, wurde zuerst von Paucker 1962 berichtet. Dieses anfangs umstrittene Ergebnis konnte später von der überwältigenden Mehrheit der Forscher bestätigt werden (u.a. Gresser 1970, Stewart 1976, Strander 1977). Wir untersuchten die antiproliferative Wirkung des ß- Interferons, während die Zellkulturen zusätzlich mit PHA bzw. PWM stimuliert wurden.

In den PHA- Kulturen fanden wir am 3. Kulturtag einen signifikanten Abfall der Mitoseraten für alle ß- Interferonkonzentrationen (50, 500, 5000 U/ml) des Präparates Fiblaferon L. Lindahl- Magnusson (1972) berichtete von einem entsprechenden Ergebnis, wobei ihr Versuchsansatz aus PHA- stimulierten Mauslymphozyten und verschiedenen tierischen Interferonen bestand. Bei Zugabe von 800 U/ml Mausinterferon fand sie für den 1. bis 4. Kulturtag eine ausgeprägte Abnahme der DNS-Synthese, die mit H^3- Thymidin- Markierung gemessen wurde. Diese Resultate wurden auch bei Stimulation durch allogene Zellen erzielt. Eine gleichzeitige Zugabe von Stimulans und Interferon erbringt eine markantere Proliferationshemmung als ein späterer (24 Stunden) Zusatz von Interferon. In unserer Versuchsanordnung wurde dieser günstige Zeitpunkt berücksichtigt. Die Proliferationsaktivität stellten wir durch Auszählen der Mitosen und Zusammenfassen im mittleren Mitoseindex fest und bestätigten die Ergebnisse an der Maus mit menschlichem ß- Interferon auf menschlichen Zellen.

Auch Weinstein (1977) steht im Einklang mit Lindahl- Magnussons Resultaten und erweiterte sie um die Feststellung, daß das zyklische AMP für die Vermittlung des antiproliferativen Effekts von Interferon keine Rolle spielt. Tovey (1981)

fand ebenfalls keinen Anstieg des zyklischen AMP in Interferonbehandelten Mausleukämiezellen, konnte aber einen Anstieg des intrazellulären GMPs nachweisen. Weinstein verwendete als Mitogene PHA, Concanavalin A (Con A) und Lipopolysaccharide; Interferon und Lymphozyten stammten von Mäusen. Die Zellteilungshemmung war um so größer, je mehr Interferon (100 bis 1000 U/ml) zugegeben wurde. Diesen Effekt konnten wir auch in den menschlichen Leukozytenkulturen mit menschlichem ß-Interferon beobachten: Der Mitoseindex in PHA- Kultur, 3.Tag, sank dosisabhängig zwar nicht signifikant, aber doch deutlich bei Zugabe von 50 und 500 U/ml ß- Interferon um 28°/oo, bei 5000 U/ml sogar um 39,5°/oo im Vergleich zur einfachen PHA-Kultur (Abb.10).

Cupples (1977) untersuchte die Einwirkung von Interferon auf normale, menschliche Lymphozyten (Disomie 21) und auf die von Patienten mit Down- Syndrom (Trisomie 21) mit Hilfe der H^3-Thymidin- Markierung. Die Lymphozyten wurden mit PHA stimuliert und mit ß- Interferon versetzt. Der antiproliferative Effekt war bei beiden Populationen vorhanden, bei den Trisomie 21- Zellen jedoch viel markanter. Deshalb nahm Cupples an, daß diese Eigenschaft genau wie die antivirale durch Gene auf Chromosom 21 geregelt wird.

Szigeti (1980) fand bei mitogen- oder antigen- stimulierten menschlichen Lymphozytenkulturen unter alpha- Interferon eine Blockierung des Leukozyten- Migrationshemmenden Faktors. Die Blockierung könnte durch eine direkte Hemmung der zellulären Proteinsynthese oder durch Aktivierung von Suppressorzellen verursacht sein. Stimulierte Lymphozyten aus PHA- Kulturen geben Lymphokinine frei, mitogen wirkende Substanzen. Die Abgabe dieser mitogenen Faktoren in PHA- Kulturen steigt unter dem Einfluß von ß- Interferon (Blomgren 1981).

Blomgren behandelte 1974 Blutkulturen gesunder Probanden mit alpha- Interferon und PHA bzw. PWM. Bei hohen PHA- Konzentrationen (1 bis 6%) war kein Effekt von Interferon (1 bis 3000 U/ml) auf die DNS- Syntheserate zu beobachten. Erst bei

erniedrigten PHA- Konzentrationen zwischen 0,03 und 1% sank die H^3- Thymidin- Aufnahme, abhängig von der alpha- Interferondosis. Unsere Kulturen enthielten PHA in einem Prozentsatz von etwa 6, ein deutlicher Einfluß auf die Mitoserate des 3. Tages war trotzdem vorhanden. Die unterschiedlichen Beobachtungen könnte man mit der größeren Empfindlichkeit unserer Methode oder den verschiedenen Interferontypen erklären.

In den PWM- Kulturen stellte Blomgren bei 100 U/ml alpha- Interferon kein Absinken der H^3- Thymidin- Aufnahme fest, obwohl niedrige, mittlere und hohe PWM- Konzentrationen zur Anwendung kamen. Eine Abnahme der DNS- Syntheserate trat erst bei extrem hohen Interferonzusätzen (10000 bis 30000 U/ml) und niedrigen PWM- Konzentrationen auf. Diese Resultate stehen im Einklang mit unseren Ergebnissen: Die Mitoseindices der vorliegenden Arbeit zeigen keine signifikante Abnahme in PWM- Kulturen, die mit ß- Interferon zwischen 50 und 5000 U/ml inkubiert waren (Abb.20).

Yen beobachtete 1981 dagegen schon bei 1000 U/ml alpha- Interferon eine antiproliferative Wirkung auf PWM- stimulierte, menschliche Blutkulturen. In seinen Versuchen zeigte sich am 4. und 6. Tag eine Hemmung der Zellteilung um 40% und sogar eine Blockierung der Differenzierung in Immunoblasten. Wir konnten keine Differenzierungshemmung mit Verminderung der Blastenzahlen feststellen (Abb.12 und 14). Yen bestätigte weiterhin die Annahme von Balkwill (1978), daß der antiproliferative Effekt von Interferon mit einer Verlängerung aller Phasen des Zellzyklus einhergeht.

Matheson verwendete für seine Untersuchungen 1981 u.a. Staphyllococcus Cowan I, ein B- Zell- Mitogen, als Stimulans. In Kulturen mit dem genannten Mitogen und Interferon stellte er eine gesteigerte Transformationsrate von Lymphozyten in Blasten fest, wobei ß- Interferon dem alpha- Typ überlegen war. In den PWM- Kulturen jedoch wurde durch beide Interferone die Blastentransformation gehemmt. Die Erklärung dieses interessanten Phänomens umgeht Matheson, indem er PWM als T-

Zell- Mitogen einstuft.

Weitere Aussagen über die immunologische Antwort stimulierter Kulturen machten Rozee (1973) und Heine (1977). Beide behandelten Mauslmphozyten mit dem T- Zell- Mitogen Con A und Mausinterferon. Auch sie stellten eine von der Interferonkonzentration abhängige Abnahme der Mitosehäufigkeit fest. Eine Vorbehandlung der Kulturen mit einer kleinen Interferonmenge ("priming") verstärkt den Effekt erheblich (Rozee). Das "priming" ist ein bekanntes Verfahren zur Steigerung der Interferonproduktion (Stewart 1971). Eine interessante Beobachtung von Heine war, daß mit zunehmendem Alter der Mäuse ihre Lymphozyten weniger H^3- Thymidin speicherten, d.h. ein alter Zellspender unter dem gleichen Interferoneinfluß eine niedrigere Proliferationsrate aufwies als ein jüngerer.

Faßt man die Ergebnisse der genannten Untersucher über T- Zell-Mitogene (Con A, PHA) zusammen, so resultierte stets eine Abnahme der DNS- Synthese unter Interferoneinfluß. Diese Übereinstimmung konnte trotz verschiedener Interferonpräparate und verschiedener Zellen menschlicher und tierischer Herkunft erzielt werden. Auch bei unseren Auswertungen konnte dieser Effekt in den PHA- Kulturen des 3. Tages nachgewiesen werden. Damit konnten wir die antiproliferative Wirkung in PHA- stimulierten Kulturen auch für menschliches ß- Interferon auf Lymphozyten gesunder Spender zeigen.

Der 5. Kulturtag erbrachte zwar noch sinkende Mitoseindices unter Interferonzusatz (Abb.10), doch waren die Werte nicht signifikant. Welche Einflüsse könnten dafür verantwortlich sein? Cesario (1979) berichtete von dialysierbaren Inaktivatoren im menschlichen Serum, die durchschnittlich 82% der antiviralen Wirkung von ß- Interferon zunichte machen. Da die antivirale von der antiproliferativen Aktivität nicht trennbar ist (Knight 1976b), könnte man Auswirkungen der Inaktivatoren in den Blutkulturen unserer Probanden vermuten. Einleuchtend erscheint eine solche Erklärung besonders für den 5. Kulturtag, da die Einwirkdauer dieser Faktoren

einen langen Zeitraum umfaßt. Eine weitere Überlegung betrifft die physikalischen Eigenschaften des menschlichen ß- Interferons. Es ist im Vergleich zum alpha- Interferon weit weniger hitzebeständig (Sedmak 1978) und kann durch mechanische Beanspruchung leicht inaktiviert werden (Cartwright 1977). Edy entdeckte 1977 eine kleine Fraktion im menschlichen ß- Interferon, die sich ähnlich wie Typ alpha als stabil erwies gegen Schütteln und Denaturierung durch Guanidinhydrochlorid. Das in dieser Arbeit verwendete Interferon ist also ein physikalisch leicht beeinflußbares Molekül, weshalb man Störungen aus diesen Gründen als potentiell möglich betrachten sollte.

Die Ergebnisse der erwähnten Forscher hinsichtlich der PWM-Kulturen sind uneinheitlich. Yen stellte bei 1000 U/ml Interferon eine Hemmung der Zellteilung fest, während Blomgren den Effekt erst bei Konzentrationen zwischen 10000 und 30000 U/ml entdeckte, obwohl beide mit alpha- Interferon und menschlichen Blutkulturen arbeiteten. Mit ß- Interferon von 50 bis 5000 U/ml sahen auch wir keine Beeinträchtigung der Mitoseaktivität in PWM- Kulturen, weder am 3. noch am 5. Tag (Abb.20).

Wie kommen nun die Unterschiede zwischen PHA- und PWM- Kulturen hinsichtlich der Mitoserate unter Interferon zustande? Ginge man davon aus, daß PHA ein schwächeres Mitogen als PWM sei, müßte das unwirksamere PHA der antiproliferativen Interferoneigenschaft weniger Widerstand bieten als ein kräftiges PWM- Stimulans. Dafür würde Blomgrens (1974) Beobachtung sprechen, daß Interferon im mittlerer und PHA in niedriger Konzentration teilungshemmend wirken, wogegen erst extrem hohe Interferoneinheiten bei niedrigen PWM- Dosen effektiv sind. Einige Tatsachen widerlegen jedoch diese Vermutungen: Eridiani fand 1969 bei einem Vergleich zwischen PHA- und PWM-Kulturen ohne Zusatz am 3. Tag eine signifikant höhere Zahl transformierter Zellen bei PHA. Douglas (1972) berichtete, daß auf PHA 80 bis 90% der Lymphozyten reagieren, auf PWM nur 40 bis 60%. Diese Informationen deuten auf eine größere mitogene Potenz des PHA. Auch wir konnten eine wesentlich

stärkere stimulatorische Kapazität des PHA gegenüber PWM nachweisen. Die PHA- Kultur ohne Interferon enthielt am 3. Tag im Mittel 74%, am 5. Tag sogar 87% Immunoblasten (Abb.2 und 4). Dagegen hatten die Immunoblasten in der einfachen PWM- Kultur nur einen relativen Anteil von 59% am 3. und von 76% am 5. Tag (Abb.12 und 14). Damit bestätigten wir in etwa die von Douglas angegebenen Werte.

Das Verhältnis von Immunoblasten zu Ausgangslymphozyten, das wir im relativen Immunoblastenindex zusammenfassen, änderte sich bei unseren Versuchen weder in PHA- noch in PWM- Kultur unter den verschiedenen ß- Interferonzusätzen (Abb.7 und 17). Die Mittelwerte der Immunoblastenindices blieben am 3. und 5. Tag bei steigenden Interferonkonzentrationen (50 bis 5000 U/ml) relativ konstant. Das Zahlenverhältnis zwischen unstimulierten und stimulierten Lymphozyten zeigte ebenfalls an beiden Kulturtagen keine charakteristischen, der Interferonwirkung zuschreibbaren Veränderungen (Abb.8 und 9 für PHA- Kulturen, Abb.18 und 19 für PWM- Kulturen). Wie schon bei den Voruntersuchern (Boll 1970) fanden sich in den mit unspezifischen Mitogenen stimulierten Blutkulturen reichlich Immunoblasten. Die relative Anzahl der Immunoblasten und der Lymphozyten blieb durch ß- Interferon im wesentlichen unbeeinflußt (Abb.1 bis 4 für PHA- Kulturen, Abb.11 bis 14 für PWM- Kulturen). Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, daß ß- Interferon keinen Effekt auf PHA- bzw. PWM- bedingte Stimulation der kleinen Lymphozyten ausübt. Die Differenzierungsfähigkeit bleibt damit unverändert, auch wenn die Mitosehäufigkeit in PHA- Kulturen geringer wird unter Interferon. Schon Eridiani (1969) fand in reinen PHA- und PWM- Kulturen keine Beziehung zwischen Transformationsrate und Mitoseindex.

Eine wichtige Entdeckung von Wheelock (1965) war, daß menschliche Leukozyten Interferon produzieren, wenn sie mit PHA stimuliert werden. Auch andere Mitogene wie PWM, Con A, LPS etc. sind in der Lage, die Produktion von gamma- Interferon (früher Immuninterferon) anzuregen. In den Kulturen existieren

zwei verschiedene Zellpopulationen: Die produzierenden Zellen gehören nicht zu denen, die auf das Mitogen mit einer erhöhten DNS- Syntheserate reagieren (Wallen 1973). Der Zusatz von Makrophagen zur Leukozytenkultur steigert die Interferonausbeute erheblich (Wiezerbin 1977). Aus diesen Informationen könnte man schließen, daß in Mitogen- stimulierten Blutkulturen außer dem exogenen Interferon auch endogenes gamma- Interferon vorhanden ist. Gedanken zu dieser Überlegung waren in der Literatur nicht zu finden, obwohl damit der interessante Aspekt der Potenzierung von Einzelinterferonen in den Blickpunkt rückt, falls die in den Zellen hergestellten Mengen dazu ausreichen. Fleischmann (1979) fand bei kombinierter Gabe von ß- und gamma- Interferon einen 5 bis 20 mal größeren Einfluß auf Mauszellen als bei getrennten Zusätzen. Die beiden Interferone potenzierten sich also in ihrer Wirkung.

Ein weiterer Gedanke gründet sich auf folgende Fakten: PHA ist ein T- Zell- Mitogen, PWM stimuliert vorwiegend B- und teilweise auch T- Zellen (Janossy 1971). Im peripheren Blut gesunder Menschen finden sich zu 60 bis 80% T- Lymphozyten und zu 10 bis 30% B- Lymphozyten. Wenn Interferon die verschiedenen Lymphozytenpopulationen unterschiedlich beeinflussen würde, könnten daraus die Differenzen zwischen den beiden Mitogenen resultieren?

Einhorn untersuchte 1980 die Wirkung von ß- Interferon auf menschliche Lymphozyten von Gesunden mit Hilfe der Rosettenmethode, um die Zelloberflächenrezeptoren der Populationen darzustellen. Unter ß- Interferon traten vermehrt Lymphozyten mit E- Rosetten auf, die durch Bindung von Schafserythrozyten an T- Zellrezeptoren entstehen. EA- und EAC- Rosetten, die sich vorwiegend um B- Zellen formieren, nahmen ab (EA) oder blieben unverändert (EAC). Einhorn vermutete den Grund für die relative T- Zellvermehrung in einer Rezeptorveränderung oder in einer beschleunigten Reifung der T- Lymphozyten. Stellt man nun für die vorliegende Arbeit eine durch Interferon reduzierte Zellgeburtsrate (Mitoseindex) unter PHA fest,

so müßten die T- Zellen gerade vermindert werden. Einhorns Ergebnisse aus unstimulierten Blutkulturen scheinen nicht direkt auf stimulierte Kulturen übertragbar zu sein. Außerdem wertete Einhorn seine Versuche schon nach 24 Stunden aus und entfernte die Monozyten aus den Kulturen. Da unsere Ergebnisse aus stimulierten 3- und 5- Tageskulturen mit Monozyten stammen, bedingt wohl die unterschiedliche Versuchsanordnung die unterschiedlichen Resultate.

Heron (1976) prüfte die Wirkung von alpha- Interferon auf menschliche, gemischte Lymphozytenkulturen im Hinblick auf die T- Zellen mit radioaktiver Markierung. Auch das Stimulans durch die Mischung der Lymphozyten zeigte unter Interferon eine verminderte Proliferationsrate. Die Killer- Zellaktivität, die der Zytotoxizität der T- Lymphozyten gleichzusetzen ist, stieg an. Ob diese Aktivitätszunahme aus einer direkten Stimulation der T- Zellen resultiert oder aus einer Hemmung der T- Suppressorzellen, ist noch ungeklärt. Rumpold (1980) berichtete dieses Phänomen für die natürlichen Killerzellen, die antikörperunabhängig bestimmte Zielzellen bekämpfen. Alpha- und ß- Interferon erbrachten das gleiche Resultat. Die zunehmende Abwehrfähigkeit der T- Zellen unter Interferoneinfluß wird auch für die Antitumor- Eigenschaft der Substanz verantwortlich gemacht. Wie eine mögliche Zusammenarbeit zwischen Proliferationshemmung und T- Zell- Zytotoxizität funktioniert, ist noch nicht endgültig geklärt.

Die Leistungen der B- Lymphozyten werden durch Interferon abgeschwächt. Gisler konnte als erster 1974 nachweisen, daß die Antikörperantwort in vitro in Mauszellkulturen durch Interferon gehemmt wurde. Das Immungeschehen war um so stärker blockiert, je mehr Mausinterferon zugesetzt wurde. Johnson (1975) bestätigte die Ergebnisse mit einem ähnlichen Testansatz und mehreren Mausinterferontypen. Auch in vivo sinkt die Antikörperproduktion (Brodeur 1975). Man kann festhalten, daß Interferon die relative Anzahl und die Aktivität der T- Zellen verstärkt, Zahl und Funktion der B- Zellen jedoch vermindert.

B unstimulierte Blutkulturen

In Blutkulturen treten mit zunehmender Inkubationsdauer vermehrt Makrophagen auf, die sich aus Monozyten differenzieren. Die Bildungsstätte der Monozyten ist das Knochenmark, wo sie aus der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle eine Entwicklung über Myeloblasten und Monoblasten durchlaufen. Im peripheren Blut reifen sie aus den Promonozyten zu voller Funktionstüchtigkeit heran. Aus den Monozyten differenzieren sich in vielen Geweben die Makrophagen. Diese Zellen haben die Aufgabe, durch Phagozytose, Speicherung und Katabolismus körperfremde Substanzen und absterbende Zellen unschädlich zu machen. Außerdem schreibt man den Makrophagen die Fähigkeit zur Synthese, Speicherung und Sezernierung von Lipiden und Proteinen zu. Dazu gehört auch das Interferon.

Ein interessantes Ergebnis der unstimulierten Blutkulturen war die Abnahme der Makrophagen am 3. und noch deutlicher am 5. Kulturtag unter steigenden ß- Interferonkonzentrationen. Der 3. Tag zeigte unter 50 bis 5000 U/ml ein dosisabhängiges Absinken der Makrophagenzahlen um insgesamt 8% im Vergleich zur einfachen Blutkultur, der 5. Tag sogar um insgesamt 24% (Abb.22).

Lee (1980) beobachtete, wie sich unter Interferoneinwirkung die Reifung von menschlichen Monozyten zu Makrophagen verzögert. Monozytenangereicherte Kulturen gesunder Spender zeigten unter ß- Interferon eine veränderte Morphologie. Die Monozyten waren kleiner und weniger gestreckt und enthielten viele Granula. Die Aktivität ihrer lysosomalen Enzyme betrug nur 30 bis 40% der unbehandelten Kontrollgruppe. Die verzögerte Reifung war in Lees Versuchen am 5. Kulturtag am deutlichsten ausgeprägt, die Monozyten glichen morphologisch denen einer 2- Tage- Kultur. Der Effekt war bei ß- Interferonkonzentrationen zwischen 30 und 1000 U/ml vorhanden. Da

solche Titer auch im Serum von Patienten nachweisbar sind, die mit Interferon behandelt wurden, könnte dieses in vitro-Modell auch für in vivo- Bedingungen gelten. Es ist zu beachten, daß die Makrophagenentstehung aus Monozyten nicht auf Zellteilungen basiert, sondern auf Differenzierung, womit Interferon hier in den Differenzierungs- bzw. Reifungsprozess eingreift. Bei den Lymphozyten war dagegen in unseren Versuchen die Differenzierungsfähigkeit unter Interferon nicht beeinträchtigt, während die Zellverdopplung gehemmt wurde (siehe A). Wir fanden keine wesentliche Veränderung der Monozytenzahlen und ihrer Morphologie unter ß- Interferoneinfluß (Abb.23), jedoch weniger Makrophagen in den Kulturen, je höher die Konzentration war (Abb.22). Das könnte entweder der Reifungsverzögerung von Monozyten zu Makrophagen zuzuschreiben sein oder einer Degeneration der Makrophagen unter Interferon. Die Differenzierungshemmung muß getrennt betrachtet werden von der Funktionsbehinderung der Monozyten, die von uns nicht untersucht wurde.

Schultz (1978) behandelte Mausmakrophagen mit Interferon und stellte mit dem Phasenkontrastmikroskop fest, daß bei den in vitro- Versuchen die Makrophagen verstärkt vakuolisiert waren und sich auf Glas weit ausbreiteten. In vivo entdeckte er dies nicht. Auch Rabinovitch (1977) konnte eine in vitro- Aktivierung der Makrophagen nachweisen. Interferoninduzierende Polyanionen (u.a. PolyI:C) bewirkten bei Injektion in Mäusen, daß ihre Peritonealmakrophagen zytotoxisch für Leukämiezellen wurden. Bei 1000 U/ml Mausinterferon verhielten sie sich zytotoxisch gegenüber Tumorzellen (Schultz 1977). Dieser Effekt resultierte aus einer direkten Aktivierung, da kein löslicher Faktor als Vermittler auszumachen war und keine gesteigerte Phagozytosetätigkeit auftrat.

Degre (1981) untersuchte die Ingestion von radioaktiv markierten E.coli- Partikeln in menschlichen Monozyten und tierischen Monozyten bzw. Makrophagen unter ß- Interferon. Niedrige und mittlere Interferonkonzentrationen (100 bis 1000 U/ml)

steigerten die Aktivität aller Zellen, während hohe Dosen (über 1000 U/ml) den gleichen Prozess unterdrückten. Auch Hovi (1981) berichtete von einer Aktivierung menschlicher Monozyten bei 1 bis 50 U/ml, die sich zeigte in der Phagozytose, der Produktion von Plasminogenaktivator und der Fähigkeit, Fibroblasten zu vernichten.

Diese Entdeckungen erweitern den Aspekt der Antitumorwirkung von Interferon, indem deutlich wird, daß neben dem antiproliferativen Effekt und der Zytotoxizitätssteigerung der natürlichen Killerzellen andere immunologische Mechanismen wirksam werden, wie die Aktivierung von Monozyten und Makrophagen. Durch die Auswertung der relativen Zellzahlen konnten wir in dieser Arbeit eine Makrophagenverminderung unter ß- Interferon nachweisen, womit über ihre Aktivität keine Aussage getroffen wird. Die Granulozytenzahlen zeigten unter Interferon keine wesentlichen Änderungen, während die Lymphozyten ihren relativen Anteil an der Gesamtzellzahl mit zunehmender Konzentration vergrößerten (Abb.21 und 24).

V. Zusammenfassung

Blutkulturen von 4 gesunden Probanden wurden mit PHA und PWM stimuliert oder unstimuliert belassen und mit 50, 500 und 5000 U/ml ß- Interferon versetzt. Die Auswertung erfolgte am 3. und 5. Kulturtag.

In den PHA- stimulierten Kulturen fanden wir keine wesentliche Veränderung des Zahlenverhältnisses von stimulierten und unstimulierten Lymphozyten zu Immunoblasten und von stimulierten zu unstimulierten Lymphozyten unter Interferon, weder am 3. noch am 5. Kulturtag. Auch der Immunoblastenindex blieb unter diesen Bedingungen etwa konstant. Somit zeigt ß- Interferon keine Beeinträchtigung der Stimulation von Lymphozyten. Die Mitoseindices der Immunoblasten allerdings fielen im Vergleich zur Kontrolle kräftig ab, am 3. Tag signifikant, und ließen den Schluß zu, daß ß- Interferon die Mitosehäufigkeit unter PHA- Stimulation senkt. Die beobachtete Dosisabhängigkeit war nicht signifikant.

In den PWM- Kulturen stellten wir unter Interferon keine veränderten Zellzahlen bei den unstimulierten und den stimulierten Lymphozyten fest, ebenso bei der Relation zwischen unstimulierten und stimulierten Lymphozyten und dem Immunoblastenindex. ß- Interferon beeinflußte also die Stimulation weder in PHA- noch in PWM- Kulturen. Die Mitoseindices fielen unter Interferon auch in den PWM- Kulturen ab, die Ergebnisse waren aber an beiden Kulturtagen nicht signifikant.

Die Häufigkeit der einzelnen Zellpopulationen in den unstimulierten Kulturen verhielt sich bei Interferonzusatz folgendermaßen: Während die Monozytenzahlen relativ konstant blieben, verminderte sich der Makrophagenanteil mit zunehmender Konzentration, besonders am 5. Kulturtag. Die Granulozyten zeigten keine großen Schwankungen, die Lymphozyten verzeichneten ansteigende Zellzahlen.

Tab.1: IBL.- Indices, relativ und absolut

		x_1		x_2		x_3		x_4		rel. Mittel-werte	abs. Mittel-werte
		rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.		
PHA	3.Tag	0,66	0,26	1,71	1,02	3,07	8,46	1,8	1,27	1,81	2,8
PHA	5.Tag	1,43	1,53	1,93	0,96	3,1	3,1	1,69	1,18	2,03	1,7
PHA 50	3.Tag	1,02	0,82	1,86	0,37	3,23	2,42	2,0	2,6	2,02	1,55
PHA 50	5.Tag	1,24	1,24	1,85	0,92	3,16	6,33	1,71	1,8	1,99	2,6
PHA 500	3.Tag	1,13	0,68	1,71	1,54	3,1	10,0	2,03	0,88	1,99	3,3
PHA 500	5.Tag	1,4	1,96	1,69	0,67	3,16	8,7	1,84	1,49	2,02	3,2
PHA 5000	3.Tag	1,02	1,64	1,23	0,49	3,13	0			1,79	0,71
PHA 5000	5.Tag	1,23	3,78	1,88	0,37	3,1	2,32			2,07	2,16
PWM	3.Tag	1,08	1,01	1,18	0,23	1,6	1,2	146	1,3	1,33	0,94
PWM	5.Tag	1,31	0,78	1,54	0,3	2,85	3,56	1,49	1,25	1,79	1,47
PWM 50	3.Tag	1,04	1,73	0,95	0,19	1,5	0,75	1,28	0,76	1,19	0,86
PWM 50	5.Tag	1,15	0,69	1,05	0,73	1,6	0,8	1,49	1,01	1,32	0,8
PWM 500	3.Tag	0,94	0,75	0,89	0,17	1,38	0,69	1,41	0,8	1,15	0,6
PWM 500	5.Tag	1,23	0,82	1,4	0,42	2,46	2,46	1,36	1,25	1,61	1,24
PWM 5000	3.Tag	0,74	0,84	0,7	0,28	1,7	1,27			1,04	0,8
PWM 5000	5.Tag	1,15	1,07	1,3	0,25	2,12	1,06			1,52	0,8

Tab.2: Signifikanzberechnung nach dem Chi^2- Verfahren
für die Mitoseindices in PHA- Kultur

		x_1		x_2		x_3		x_4				
		M	TZ	M	TZ	M	TZ	M	TZ	ΣM	ΣTZ	MI^o/oo
PHA	3d	2	79	3	249	7	277	26	295	38	900	42,2
	5d	3	171	0	188	0	186	9	178	12	723	16,5
PHA	3d	0	122	3	181	0	194	8	260	11	757	14,5
+50	5d	0	74	2	270	0	190	3	161	5	695	7,1
PHA	3d	0	135	2	146	0	93	7	241	9	615	14,6
+500	5d	0	167	0	164	3	190	4	218	7	793	9,4
PHA	3d	1	122	0	120	0	94			1	336	2,9
+5000	5d	1	147	6	183	0	186			7	516	13,5

3.Tag	E_M	E_N	B_N	B-E	$(B-E)^2$	$\frac{(B-E)^2}{E}$	Chi^2	p bei Freiheitsgrad 1
PHA	26,6	873,4	862	M 11,4 N-11,4	130	M 4,9 N 0,15	11	0,0009
PHA 50	22,4	734,6	746	M-11,4 N 11,4		M 5,8 N 0,18		
PHA	27,9	872,1	862	M 10,1 N-10,1	102	M 3,7 N 0,12	9,3	0,0027
PHA 500	19,1	595,9	606	M-10,1 N 10,1		M 5,3 N 0,17		
PHA	28,4	871,6	862	M 9,6 N-9,6	92,2	M 3,2 N 0,11	12,3	0,003
PHA 5000	10,6	325,4	335	M-9,6 N 9,6		M 8,7 N o,28		
5.Tag								
PHA	8,7	714,3	711	M 3,3 N-3,3	10,9	M 1,25 N 0,01	2,57	0,12
PHA 50	8,3	686,7	690	M-3,3 N 3,3		M 1,3 N 0,01		
PHA	9,4	713,6	711	M 2,6 N-2,6	6,8	M 0,7 N 0,01	1,42	0,22
PHA 500	9,6	729,4	732	M-2,6 N 2,6		M 0,7 N 0,01		
PHA	11,1	711,9	711	M 0,9 N-0,9	0,8	M 0,1 N 0,001	0,2	0,66
PHA 5000	7,9	508,1	509	M-0,9 N 0,9		M 0,1 N0,001		

Tab.3: Signifikanzberechnung nach dem Chi^2- Verfahren für die Dosisabhängigkeit der Mitoseindices in PHA- Kultur, 3.Tag

	B_M	B_{M+N}	E_M	E_N	B_N	B-E	$(B-E)^2$	$\frac{(B-E)^2}{E}$	Chi^2	p bei Freiheitsgrad 1
PHA 50	11	757	8,31	748,69	746	M 2,69 N-2,69	7,23	M 0,87 N 0,01	3,05	0,075
PHA 5000	1	336	3,68	332,32	335	M-2,69 N 2,69		M 1,96 N 0,21		
PHA 500	9	615	6,46	608,54	606	M-2,54 N 2,54	6,4	M 0,99 N 0,01	2,82	0,09
PHA 5000	1	336	3,53	332,47	335	M 2,54 N-2,54		M 1,81 N 0,01		

Tab.4: Signifikanzberechnung nach dem Chi^2- Verfahren
für die Mitoseindices in PWM- Kultur

		x_1		x_2		x_3		x_4				
		M	TZ	M	TZ	M	TZ	M	TZ	ΣM	ΣTZ	MI°/oo
PWM	3d	8	129	2	115	0	96	10	207	20	547	36,6
	5d	3	156	5	150	10	257	7	225	25	788	31,7
PWM	3d	5	186	5	139	9	181	3	235	22	741	29,7
+50	5d	5	137	1	153	5	144	6	206	17	640	26,6
PWM	3d	9	168	0	87	3	83	6	198	18	536	33,6
+500	5d	0	147	6	205	6	222	1	143	13	717	18,1
PWM	3d	6	89	3	102	0	51			9	242	37,2
+5000	5d	7	137	4	190	4	191			15	581	29,0

3.Tag	E_M	E_N	B_N	B-E	$(B-E)^2$	$\frac{(B-E)^2}{E}$	Chi^2	p bei Freiheitsgrad 1
PWM	17,8	529,2	527	M 2,2 N-2,2	4,8	M 0,27 N 0,009	0,06	0,48
PWM 50	24,2	716,8	719	M-2,2 N 2,2		M 0,2 N 0,006		
PWM	19,2	527,8	527	M 0,8 N-0,8	0,6	M 0,03 N 0,001	0,06	0,805
PWM 500	18,8	517,2	518	M-0,8 N 0,8		M 0,03 N 0,001		
PWM	20,1	526,9	527	M-0,1 N 0,1	0,01	M 0,0004 N 0,00001	0,0015	0,97
PWM 5000	8,9	233,1	233	M 0,1 N-0,1		M 0,001 N 0,00004		
5.Tag								
PWM	23,2	764,8	763	M 1,8 N-1,8	3,2	M 0,13 N 0,004	0,31	0,58
PWM 50	18,8	621,2	623	M-1,8 N 1,8		M 0,17 N 0,005		
PWM	20	768	763	M 5 N-5	26	M 1,3 N 0,03	2,8	0,09
PWM 500	18,1	698,9	704	M-5 N 5		M 1,43 N 0,03		
PWM	24,1	763,9	763	M 0,9 N-0,9	0,8	M 0,03 N 0,001	0,082	0,78
PWM 5000	15,9	502,1	503	M-0,9 N 0,9		M 0,05 N 0,001		

VII Literaturverzeichnis

Balkwill,F., Taylor- Papadimitriou, J.
Interferon affects both G_1 and $S + G_2$ in cells stimulated from quiescence to growth.
Nature 274, 798, 1978

Billiau, A., Joniau, M., De Somer, P.
Mass production of human interferon in diploid cells stimulated by polyI:C.
J. Gen. Virol. 19, 1, 1973

Blalock, J.E., Georgiades, J.A., Langford, M.P., Johnson, H.M.
Purified human immune interferon has more potent anticellular activity than fibroblast or leucocyte interferon.
Cell. Immunol. 49, 390, 1980

Blomgren, H., Strander, H., Cantell, K.
Effect of human leucocyte interferon on the response of lymphocytes to mitogenic stimuli in vitro.
Scand. J. Immun. 3, 697, 1974

Blomgren, H., Einhorn, S.
Lymphokine production by PHA stimulated human lymphocytes is enhanced by interferon.
Antiviral Research 21- 24 April 1981, 19

Boll, I.
Lymphozytenstimulierung mit Phytohämagglutinin.
S. 387 1. Tagesbericht der Österreichischen Ges. f. Hämat. 1971, Verlag Wiener Medizinische Akademie 1972

Brodeur, B.R., Merigan, T.C.
Mechanism of the suppressive effect of interferon on antibody sythesis in vivo.
J. Immunol. 114, 1323, 1975

Cartwright, T., Senussi, O., Grady, M.D.
The mechanism of the inactivation of human fibroblast interferon by mechanical stress.
J. Gen. Virol. 36, 317, 1977

Cesario, T., Vaziri, N., Slater, L., Tilles, J.
Inactivators of fibroblast interferon found in human serum.
Infect. Immun. 24/3, 851, 1979

Chany, C., Finaz, C., Weil, D., Vignal, M., van Cong, N., de Gronchy, J.
Investigations on the chromosomal localizations of the human and chimpanzee interferon genes: possible roles of chromosome 9 and 13.
Antiviral Research 21- 24 April 1981, 12

Cupples, C.G., Tan, Y.H.
Effect of human interferon preparations on lymphoblastogenesis in Down's syndrome.
Nature 267, 165, 1977

Dahl, H., Degree, H.
Human interferon and cell growth inhibition
I. Inhibitory effect of human interferon on the growth rate of cultured human cells.
Acta Pathol. Microbiol. Scand. B 84, 285, 1976

Degre, M., Rollag, H., Mobland, B., Sonnenfeld, G., De Lay, M.
Interferon effects on phagocytic cells
Antiviral Research 21- 24 April 1981, 14

Derynck, R., Content, J., De Clercq, E., Volckaerd, G., Tavenier, J., Devos, R., Fiers, W.
Isolation and structure of a human fibroblast interferon gene.
Nature 285, 542, 1980

Dianzini, F.
Kinetics of the rapid action of interferon.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 152, 593, 1976

Douglas, S.D.
Human lymphocyte growth in vitro: morphologic, biochemical and immunologic significance.
Int. Rev. Exp. Path. 10, 41, 1971

Douglas, S.D.
Electron microscopic and functional aspects of human lymphocyte response to mitogens.
Transpl. Rev. 11, 39, 1972

Edy, V.G., Desmyter, J., Billiau, A., De Somer, P.
Stable and unstable forms of human fibroblast interferon.
Infect. Immun. 16, 445, 1977

Einhorn, S., Blomgren, H., Troye, M.
Proportion of lymphocytes forming E, EA and EAC rosettes following treatment with interferon preparations in vitro.
Cell. Immun. 56, 374, 1980

Elves, M.E.
The lymphocytes
London Lloyd- Luke 1972

Eridiani, S., Valentini, R., Giangrande, A., Ponti, G.B.
Cell culture reactivity of human lymphocytes to pokeweed- mitogen in comparison to phytohemagglutinin.
Int. Arch. Allergy 35, 270, 1969

Farnes, P., Barker, B.E., Brownhill, L.E., Fanger, H.
Mitogenic activity in phytolacca americana (pokeweed).
Lancett II, 1100, 1964

Fleischmann, W.R., Georgiades, J.A., Osborne, C., Johnson, H.M.
Potentiation of interferon activity by mixed preparations of fibroblast and immune interferon.
Infect. Immun. 26, 248, 1979

Friedman, R.M.
Interferons and cancer
J. Natl. Cancer Inst. 60/6, 1191, 1978

Fuchs, G.
Mathematik für Mediziner und Biologen
Springer Verlag Berlin 1969

Gisler, R.H., Lindahl, P., Gresser, J.
Effects of interferon on antibody sythesis in vitro
J. Immun. 113/2, 438, 1974

Gresser, J., Brouty- Boyé, D., Thomas, M.T., Macieira- Coelho, A.
Interferon and cell division
I. Inhibition of the multiplication of mouse leukemia L1210 cells in vitro by interferon preparations.
Proc. Nat. Acad. Sci. 66/4, 1052, 1970

Gresser, J.
Commentary on the varied biologic effects of interferon.
Cell. Immunol. 34, 406, 1977

Havell, E.A., Vilcek, J.
Production of high titered interferon in cultures of human diploid cells.
Antimicrob. Agents Chemother. 2/6, 476, 1972

Heine, K.M.
Funktion und Funktionsprüfung des lymphatischen Systems.
Akademieverlag Berlin, 1973

Heine, J.W., Adler, W.H.
The quantitative production of interferon by mitogen stimulated mouse lymphocytes as a function of age and its effect on the lymphocytes proliferative response.
J. Immun. 118/4, 1366, 1977

Heron, I., Berg, K., Cantell, K.
Regulation effect of interferon on T cells in vitro
J. Immunol. 117, 1370, 1976

Houghten, M., Eaton, M.A.W., Stewart, A.G., Smith, J.C., Doel, S.M., Catlin, G.H., Lewis, H.M., Patel, T.P., Emtage, J.S., Carey, N.H., Porter, A.G.
The complete amino acid sequence of human fibroblast interferon as deduced using synthetic oligodesoxyribonucleotide primers of reverse transcriptase.
Nucleic Acids Research 8/13, 2885, 1980

Hovi, T., Saksela, O., Linnavuori, K., Vaheri, A., Cantell, K.
Activation of monocyte function by interferons
Antiviral Research 21- 24 April 1981, 18

Isaacs, A., Lindenmann, J.
Virus interference I The interferon
Proc. R. Soc. Lond. (Biol.) 147, 258, 1957

Janossi, G., Greaves, M.F.
Lymphocyte activation
I Response of T and B lymphocytes to phytomitogens.
Clin. Exp. Immunol. 9, 483, 1971

Johnson, H.M., Smith, B.G., Baron, S.
Inhibition of the primary in vitro antibody response by interferon preparations.
J. Immunol. 114/1, 403, 1975

Knight, E.
Interferon: purification and initial characterization from human diploid cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73/2, 520, 1976 a

Knight, E.
Antiviral and cell growth inhibitory activities reside in the same glycoprotein of human fibroblast interferon.
Nature 262, 302, 1976 b

Knight, E., Korant, B.D.
A cell surface alteration in mouse L- cells induced by interferon.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 74, 707, 1977

Lee, S.H.S., Epstein, L.B.
Reversible inhibition by interferon on the maturation of human peripheral blood monocytes to macrophages.
Cell. Immun. 50, 177, 1980

Lindahl, P., Leary, P., Gresser, J.
Enhancement by interferon of the specific cytotoxity of sensitized lymphocytes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69/3, 721, 1972

Lindahl- Magnusson, P., Leary, P., Gresser, J.
Interferon inhibits DNA synthesis induced in mouse lymphocyte suspensions by phytohemagglutinin or by allogenic cells.
Nature New Biol. 237, 120, 1972

De Maeyer, D., De Maeyer, J., Vandeputte, M.
Inhibition by interferon of the delayed type hypersensitivity in the mouse.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 1753, 1975

Matheson, D.S., Green, B., Tan, Y.H.
The enhancement of B cell mitogenesis by human interferon is controlled by chromosome 21.
Antiviral Research 21- 24 April 1981, 15

Maurer, H.R.
Interferone- brauchbare Antivirus- und Anti-krebsmittel?
Otsche Apothekerzeitung 41, 1611, 1979

Mendes, N.F., Zenha, M.J., Musatti, C.S., Naspitz, C.K.
Lymphocyte membrane receptors in cultures treated with mitogenes.
Cell. Immunol. 12, 331, 1974

Mobraaten, L.E., De Maeyer, D., De Maeyer, J.
Prolongation of allograft survival in mice by induction of interferon.
Transplantation 16, 415, 1973

Myers, M.W., Friedman, R.M.
Potentiation of human interferon production by superinduction.
J. Natl. Cancer Inst. 47, 757, 1971

Novell, P.C.
Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leucocytes.
Cancer Res. 20, 462, 1960

Paucker, K., Cantell, K., Henle, W.
Quantitative studies on viral interference in suspended L cells.
III Effect on interfering viruses and interferon on the growth rate of cells.
Virology 17, 324, 1962

Polgar, P.R., Kibrick, S., Foster, J.M.
Reversal of PHA induced blastogenesis in human lymphocyte cultures.
Nature 218, 596, 1968

Rabinovitch, M., Manejias, R.E., Russo, M., Abbey, E.F.
Increased spreading of macrophages from mice treated with interferoninducers.
Cell. Immun. 29, 86, 1977

Roitt, J.M., Greaves, M.F., Torrigani, G., Brostoff, J., Playfair, J.H.L.
The cellular basis of immunological responses.
A synthesis of some current views.
Lancett II, 367, 1969

Rozee, K.R., Lee, S.H.S., Ngan, J.
Effect of priming on interferon inhibition of Con A induced spleen cell blastogenesis.
Nature New Biol. 245, 16, 1973

Rumpold, H., Kraft, D., Scheiner, D., Meindl, P., Bodo, G.
Enhancement of NK but not K cell activity
by different interferons.
Int. Archs. Allergy appl. Immun. 62, 152, 1980

Schultz, R.M., Papamatheakis, J.D., Chirigos, M.A.
Interferon: an inducer of macrophage activation
by polyanions.
Science 197, 674, 1977

Schultz, R.M., Chirigos, M.A., Heine, U.J.
Functional and morphologic characteristics of
interferon treated macrophages.
Cell. Immunol. 35, 84, 1978

Sedmak, J.J., Jameson, P., Grossberg, S.E.
Thermal and vortical stability of purified
human fibroblast interferon.
Adv. Exp. Med. Biol. 110, 133, 1978

Skurkovich, S.V., Klinova, E.G., Aleksandrovskaia, I.M.,
Levina, N.V., Arkhipova, N.A., Bulicheva, T.J.
Stimulation of transplantation immunity and
plasma cell reaction by interferon in mice.
Immunology 25, 317, 1973

Slate, D.L., Ruddle, F.H.
Fibroblast interferon in man is coded by two
loci on separate chromosomes.
Cell 16, 171, 1979

Stewart II, W.E., Gosser, L.B., Lockhard jr, R.Z.
Priming: a nonantiviral function of interferon.
J. Virol. 7/6, 792, 1971

Stewart II, W.E., Gresser, I., Tovey, M.G., Bandu, M.T., Le Goff, S.
Identification of the cell multiplication inhibitory factors in interferon preparations as interferons.
Nature 262, 300, 1976

Stewart II, W.E.
Interferon nomenclature recommendations
J. Infect. Dis. 142/4, 643, 1980

Stewart II, W.E.
The interferon system
Springer Verlag 1981

Strander, H., Einhorn, S.
Effect of human leucocyte interferon on the growth of human osteosarcoma cells in tissue culture.
Int. J. Cancer 19, 468, 1977

Szigeti, R., Masucci, M.G., Klein, E., Klein, G.
Interferon suppresses antigen and mitogen induced leucocyte migration inhibition.
Nature 288, 594, 1980

Tan, Y.H., Armstrong, J.A., Ke, Y.H., Ho, M.
Regulation of cellular interferon production: enhancement by antimetabolites.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67, 464, 1970

Tan, Y.H.
Chromosome 21 and the cell growth inhibitory effect of human interferon preparations.
Nature 260, 141, 1976

Tan, Y.H., Bakarat, F., Berthold, W., Smith-Johannsen, H., Ta
The isolation and amino acid/sugar composition of human fibroblastoid interferon.
J. Biol. Chem. 254, 8067, 1979

Taniguchi, T., Ohno, S., Fuji- Kuriyama, Y., Muramatsu, M.
The nucleotide sequence of human fibroblast interferon cDNA.
Gene 10, 11, 1980

Tovey, M.G., Rochette- Egly, C.
Rapid increase in guanosine 3'5'cyclic monophosphate in interferon treated cells.
Antiviral Research 21- 24 April 1981, 16

Vengris, V.E., Reynolds, F.H., Hollenberg, M.D., Pitha, P.M.
Interferon action: role of membrane gangliosides.
Virology 72, 486, 1976

Vilcek, J., Havell, E.A., Yamazaki, S.
Antigenic, physiochemical and biologic characterrization of human interferons.
Ann. NY Acad. Sci. 284, 703, 1977

Vilcek, J., Havell, E.A., Gradoville, M.L., Mika- Johnson, M., Douglas, W.H.J.
Selection of new human foreskin fibroblast cell strains for interferonproduction.
Adv. Exp. Med. Biol. 110, 110, 1978

Wallen, W.C., Dean, J.H., Lucas, D.D.
Interferon and the cellular immune response: separation of interferon producing cells from DNA synthetic cells.
Cell. Immun. 6, 110, 1973

Weinstein, Y., Brodeur, B.R., Melmon, K.L., Merigan, T.C.
Interferon inhibition of lymphocyte mitogenesis.
Immunology 33, 313, 1977

Wheelock E.F.
Interferon like virus inhibitor induced human leucocytes by phytohemagglutinin.
Science 149, 310, 1965

Wietzerbin, J., Stephanos, S., Falcoff, R., Falcoff, E.
Some properties of interferons induced by stimulants of T and B lymphocytes.
Tex. Rep. Biol. Med. 35, 205, 1977

Yen, A., Lewin, D., Fairchild, D.
Interferon retards PWM induced B cell proliferation and inhibits B cell differentiation to plasmacytes.
Proc.17 Ann. Meeting of the American Society of Clinical Oncology April 1981, 209

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. I. Boll für die freundliche Überlassung des Themas und die großzügige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Diese Arbeit wurde unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Lebenslauf:

Claudia Kretzschmar

26. 5. 1955	in Backnang geboren als Tochter von Ursula Kretzschmar, geb. Gitter, und Dr. jur. Heinz Kretzschmar
1962	Einschulung in die K- 5- Grundschule in Mannheim
1966	Besuch des Liselottegymnasiums in Mannheim
1974	Reifezeugnis
1975	einjährige Ausbildung zur Krankenpflegehelferin an den Städt. Krankenanstalten Mannheim, anschließend dort eingestellt bis zum
WS 1976/77	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin
1978	Physikum
1979	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1982	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1983	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung